

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. MICHAELA VAŠKOVÁ

**Vývoj antibakteriálních protilátek pro pacienty s cystickou fibrosou**

**Development of antibacterial antibodies for cystic fibrosis patients**

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2019

# Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně ocitovala.

V Praze dne:

Podpis

## Poděkování

Ráda bych poděkovala prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení a pomoc při zpracování této diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala kolektivu katedry biochemie, zejména Mgr. Janu Královi, Bc. Kateřině Dostálové a Kateřině Vyhnaňové za spolupráci a pomoc během experimentální činnosti. V neposlední řadě chci poděkovat paní laborantce Anně Ammerové za její ochotu a vytvoření nadstandardního technického zázemí na katedře biochemie.

# Abstrakt

Autozomálně recesivní onemocnění cystická fibrosa (CF) způsobené mutacemi genu *CFTR* („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) vede k absenci či defektům *CFTR* proteinu s funkcí chloridového kanálu. Pro toto onemocnění je typická zejména náchylnost k bakteriálním infekcím dýchacího ústrojí z důvodu hromadění zahuštěného hlenu a pozměněné glykosylace v plicích. Tyto infekce nejčastěji způsobuje bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (PA), k jejíž patogenitě přispívá i lektin PA-IIL. Tento lektin má vysokou afinitu k L-fukose a patří mezi adhesiny PA. Tato práce je zaměřena na studium vlivu anti-PA-IIL protilátek izolovaných z vaječných žloutků a multivalentních inhibitorů PA-IIL na bázi fukosy na adherenci PA k buňkám plicního epitelu.

Protilátky byly izolovány z vaječných žloutků slepice před a po imunizaci lektinem PA-IIL. Specifické anti-PA-IIL protilátky byly získány afinitní chromatografií na koloně s imobilizovaným PA-IIL. Metodou ELISA byla ověřena schopnost těchto protilátek rozpoznat PA-IIL. Přítomnost PA-IIL v bakteriální kultuře *Pseudomonas aeruginosa* (PAK, ST 1763) a schopnost protilátek rozpoznat tento bakteriální lektin byla ověřena pomocí metody Western blot s následnou imunodetekcí. Byly též zjištěny vhodné podmínky kultivace pro expresi tohoto lektinu.

Vliv protilátek na adhezi PAK byl studován *ex vivo* s využitím plicní epitelální buněčné linie od CF pacienta (CuFi-1) a od zdravého jedince (NuLi-1). Buněčné linie a bakterie byly fluorescenčně značeny barvivou PKH. Nejprve bylo ověřeno, že počet subkultur buněčných linií nemá vliv na jejich chování v *ex vivo* modelu bakteriální adheze. Specifické anti-PA-IIL protilátky nevykázaly schopnost ovlivnit adhezi PAK k buňkám plicního epitelu. Pozorovaný inhibiční efekt slepičích protilátek nebyl specifický ani reprodukovatelný a je pravděpodobně závislý na mnoha proměnných.

S využitím linie CuFi-1 byl pro srovnání studován efekt multivalentních inhibitorů PA-IIL na bázi fukosy. Některé tyto inhibitory vykazovaly schopnost výrazně snížit adherenci PAK na plicní epitelální buňky (až o 70 %) a představují tak možný prostředek prevence PA infekcí u pacientů s CF.

Klíčová slova: cystická fibrosa, *Pseudomonas aeruginosa*, IgY, multivalentní inhibitory

# Abstract

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease caused by mutations in the *CFTR* gene (CF transmembrane conductance regulator). These mutations result in absent or defective CFTR chloride channel function. The susceptibility to bacterial respiratory infections due to the accumulation of thickened mucus and altered glycosylation in lungs is typical for this disease. Bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (PA) is a major cause of these infections. Among other virulent factors, the pathogenicity of these bacteria is caused by fucose-specific PA-IIL lectin which plays a role as an adhesin. The effect of anti-PA-IIL egg yolk antibodies and multivalent fucose-based PA-IIL inhibitors on PA adherence to lung epithelial cells was studied in this work.

Chicken antibodies were isolated from egg yolks before and after immunization with antigen PA-IIL. Specific anti-PA-IIL antibodies were obtained by affinity chromatography using a column with an immobilized PA-IIL. Reactivity of IgY was verified by ELISA. The presence of PA-IIL in the bacterial culture of *Pseudomonas aeruginosa* (PAK, ST 1763) and the ability of antibodies to recognize this bacterial lectin were verified by Western blotting followed by immunodetection. Appropriate culture conditions have also been found for the expression of this lectin. The effect of antibodies on PAK adhesion was studied *ex vivo* using a lung epithelial cell line from a CF patient (CuFi-1) and a healthy individual (NuLi-1). Cell lines and bacteria were fluorescently labeled with PKH dyes.

It was found that the number of subcultures of cell lines does not affect their behavior in the *ex vivo* model of bacterial adhesion. Specific anti-PA-IIL antibodies did not show the ability to affect PAK adhesion to lung epithelial cells. The observed inhibitory effect of chicken antibodies was neither specific nor reproducible and is probably dependent on many variables.

For comparison, the effect of fucose-based multivalent PA-IIL inhibitors was studied on CuFi-1 cell line. Some of these inhibitors significantly reduced PAK adherence to lung epithelial cells (up to 70 %) and thus represent a possible means of preventing PA infections in CF patients.

**Key words:** cystic fibrosis, *Pseudomonas aeruginosa*, IgY, multivalent inhibitors

# Obsah

Seznam zkratek .....	1
1 Teoretický úvod.....	2
1.1 Cystická fibrosa.....	2
1.1.1 Úvod.....	2
1.1.2 Genetika.....	2
1.1.3 CFTR protein .....	3
1.1.4 Patofyziologie dýchacích cest.....	4
1.1.4.1 Změny glykosylace v dýchacích cestách a bakteriální infekce .....	5
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	7
1.2.1 Faktory virulence .....	9
1.2.2 Lektiny PA.....	10
1.2.2.1 PA-IIL .....	11
1.3 Potenciální anti-PA-IIL inhibitory .....	12
1.3.1 Slepíčí protilátky .....	13
1.3.2 Multivalentní inhibitory na bázi sacharidů .....	15
2 Cíl práce .....	17
3 Materiál a metody.....	18
3.1 Použité přístroje a materiál .....	18
3.1.1 Přístroje.....	18
3.1.2 Materiál.....	20
3.2 Příprava slepičích protilátek .....	23
3.2.1 Izolace protilátek z vaječných žloutků .....	23
3.2.2 Afinitní chromatografie .....	24
3.2.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu .....	25
3.2.4 ELISA.....	25

3.3	Tkáňové kultury .....	27
3.3.1	Rozmrazení buněčných kultur .....	27
3.3.2	Kultivace buněčných linií.....	27
3.3.3	Příprava kultivačního povrchu.....	28
3.3.4	Subkultivace buněčných linií.....	28
3.3.5	Stanovení počtu a viability buněk .....	29
3.3.6	Zamrazení buněčných kultur .....	29
3.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	30
3.4.1	Kultivace PAK.....	30
3.4.2	Zamrazení PAK .....	30
3.4.3	Kvantifikace bakterií ve vzorku.....	31
3.4.4	Stanovení růstové křivky a exprese PA-IIL .....	31
3.5	Fluorescenční značení buněk s využitím barviv PKH .....	31
3.5.1	Fluorescenční značení bakteriálního kmene PAK barvivem PKH26 .....	32
3.5.2	Fluorescenční značení buněčných linií barvivem PKH67.....	33
3.6	Adhezní test .....	33
3.7	Elektroforéza a Western blot .....	36
3.7.1	Příprava vzorků.....	36
3.7.2	Stanovení koncentrace proteinu v bakteriálním lyzátu .....	36
3.7.3	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu .....	37
3.7.4	Western blot s následnou imunodetekcí.....	38
4	Výsledky .....	41
4.1	Izolace protilátek z vaječných žloutků .....	41
4.1.1	Ověření specifity izolovaných protilátek metodou ELISA .....	42
4.2	Afinitní chromatografie .....	43
4.2.1	Vyhodnocení afinitní chromatografie metodou ELISA .....	45

4.3	Porovnání reaktivity vybraných frakcí protilátek s různými modifikacemi PA-IIL	47
4.3.1	Western blot s následnou imunodetekcí.....	47
4.3.2	ELISA.....	48
4.4	Studium přítomnosti PA-IIL v bakteriální kultuře.....	48
4.4.1	Růstová křivka .....	49
4.4.2	Western blot s následnou imunodetekcí.....	49
4.5	Adhezní testy .....	52
4.5.1	Adhezní testy se slepičími protilátkami .....	52
4.5.1.1	Srovnání efektu vybraných frakcí na původní vs. nové buněčné linie ..	52
4.5.1.2	Adhezní testy s afinitně purifikovanými frakcemi.....	55
4.5.1.3	Adhezní testy ověřující specifitu frakce 3S1 .....	60
4.5.2	Adhezní testy s multivalentními inhibitory na bázi fukosy.....	61
5	Diskuze .....	64
6	Souhrn.....	71
	Seznam použité literatury .....	72



# Seznam zkratek

ASL	„airway surface liquid“, povrchová plicní kapalina
APS	„ammonium persulfate“, peroxodisíran amonný
ATP	adenosintrifosfát
BCA	„bicinchoninic acid“, kyselina bicinchoninová
BEGM	„Bronchial Epithelial Cell Growth Medium“
BSA	bovinní sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CF	cystická fibrosa
CFTR	„cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethyldiamintetraoctová kyselina
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
ENaC	„epithelial sodium channel“, epitelový sodný kanál
FBS	fetální bovinní sérum
Ig	imunoglobulin
kb	kilobáze, 1000 nukleotidů (bází)
kDa	kilodalton, jednotka molekulové hmotnosti
LB	Luria-Bertani médium
LHC	„Laboratory of Human Carcinogenesis“
LPS	lipopolysacharid
M9	minerální médium
OD <sub>600</sub>	optická denzita při vlnové délce 600 nm
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAK	kontrolní kmen <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA-IL, PA-IIL	lektin I a II bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA-IIL ΔG/fuc	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> lektin II s mutací snižující afinitu pro fukosu
PBS	„phosphate buffered saline“, fosfátový pufr
PS	speciální médium pro <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PVDF	polyvinylidenfluorid
RPM	„revolutions per minute“, otáčky za minutu
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
TBS	„Tris-buffered saline“, trisový pufr
TEMED	tetramethylethyldiamin

# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Cystická fibrosa

### 1.1.1 Úvod

Cystická fibrosa (CF) je genetické onemocnění způsobené mutacemi genu *CFTR* („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“), který kóduje stejnojmenný protein s funkcí chloridového kanálu. Defekt či absence tohoto proteinu vede k ovlivnění transportu solí a vody dovnitř a ven z epiteliálních buněk. V důsledku toho dochází ke zvýšené vazkosti hlenu na sliznicích a postižení mnoha tělních systémů. Typické je zejména progresivní poškození dýchacího ústrojí způsobené častými bakteriálními infekcemi a chronické postižení zažívacího traktu, jehož příčinou je nedostatečná funkce pankreatu. Ovlivněny jsou též potní žlázy, ve kterých dochází k tvorbě slanějšího potu, než je obvyklé<sup>1</sup>.

Lepší porozumění genetické podstaty nemoci a pokroky v léčbě zvýšily za posledních 70 let průměrnou délku života pacientů z 6 měsíců věku na 43 let. Navzdory tomu se však stále s nemocí pojí závažné fyziologické příznaky a snížená kvalita i délka života a CF se tak řadí mezi nejčastější život ohrožující autozomálně recesivní onemocnění postihující kavkazskou populaci<sup>2,3</sup>. V České republice je incidence tohoto onemocnění přibližně 1/4023, na 4023 novorozenců tedy připadá jedno dítě s CF<sup>4</sup>.

### 1.1.2 Genetika

CF je monogenní autozomálně recesivní onemocnění - nemoc se tudíž projeví pouze u homozygota, tedy jedince s dvěma defektními alelami genu. Heterozygoti, jedinci s jednou defektní alelou, jsou pouze přenašeči bez klinických projevů nemoci. Nejčastější mutací *CFTR* genu je delece fenylalaninu v pozici 508 ( $\Delta F508$ ), která je v České republice zastoupena u 70 % nemocných CF<sup>5</sup>. Mutace se klasifikují do 6 skupin podle mechanismu, jakým narušují transportní funkci CFTR proteinu:

- I. třída: narušení syntézy proteinu vedoucí k úplné ztrátě CFTR proteinu a tím i jeho funkce
- II. třída: porucha maturace a transportu CFTR proteinu vedoucí k absenci funkčního proteinu na apikální membráně epiteliálních buněk (např.  $\Delta F508$ )

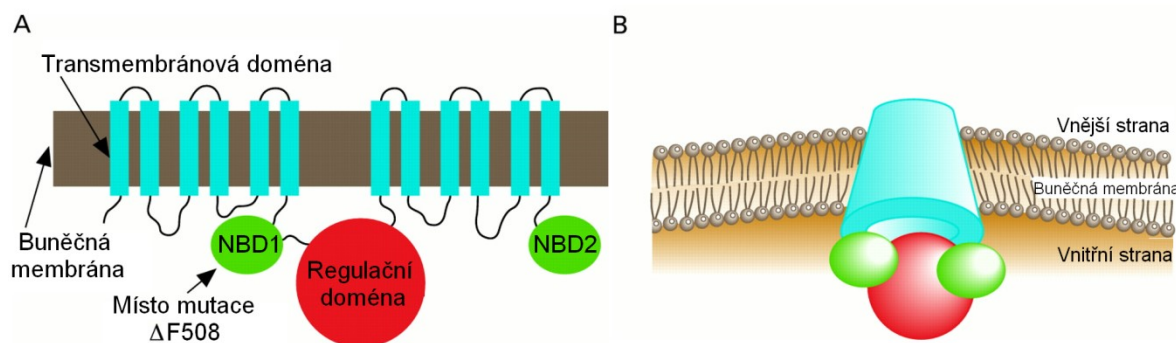
- III. třída: narušení aktivace a regulace mutantních CFTR, které jsou sice přítomné na apikální membráně, ale jsou nefunkční
- IV. třída: poškození či snížení vodivosti chloridového kanálu, přičemž je zachováno množství a správné umístění CFTR proteinu na apikální epitelální membráně
- V. třída: snížení množství funkčního CFTR proteinu v buňce a na její apikální membráně v důsledku snížení produkce proteinu
- VI. třída: snížení množství funkčního CFTR proteinu na apikální membráně v důsledku zvýšené rychlosti jeho odstraňování z membrány.

*CFTR* gen je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 7 (7q21-34). Jeho velikost je přibližně 190 kb a skládá se z 27 exonů. Tyto exony kódují mRNA transkript (6,5 kb), který se překládá do proteinu sestávajícího z 1480 aminokyselin<sup>3</sup>.

### 1.1.3 CFTR protein

CFTR je multidoménový transmembránový protein, který patří do rodiny ABC transportérů („ATP-binding cassette“, ATP-vázací). Jedná se o ATP dependentní chloridový kanál umístěný v apikální membráně epitelálních buněk. Jeho struktura se skládá ze dvou transmembránově uložených domén (TMD1 a TMD2, „transmembrane-spanning domain“), z nichž každá obsahuje šest transmembránových segmentů (TM1 až TM12), dále dvou domén vázajících nukleotidy (NBD1 a NBD2, „nucleotide binding domain“) a unikátní regulační domény (RD), která je silně polární a obsahuje několik fosforylačních míst<sup>6,7</sup> (obrázek 1, str. 4).

CFTR zajišťuje cAMP zprostředkovanou sekreci  $\text{Cl}^-$ , a to zejména v pankreatu, střevech a dýchacích cestách. CFTR hraje zásadní roli v transepitelálním transportu elektrolytů a tekutin, a to nejen díky své funkci iontového kanálu, ale také díky regulaci iontových transportérů v epitelálních buňkách. Jeho transmembránové domény tvoří póry selektivní pro anionty, které prochází přes membránu v závislosti na elektrochemickém gradientu. To je důvodem, proč v intestinálním, pankreatickém a dýchacím epitelu pohání tok  $\text{Cl}^-$  a  $\text{HCO}_3^-$ , zatímco v potních žlázách zprostředkovává absorpci  $\text{Cl}^-$ , kterou pasivně následují  $\text{Na}^+$ . Póry CFTR mohou být navíc v důsledku změny konformace propustné i pro větší anionty než  $\text{Cl}^-$  (např.  $\text{HCO}_3^-$ )<sup>8-10</sup>.



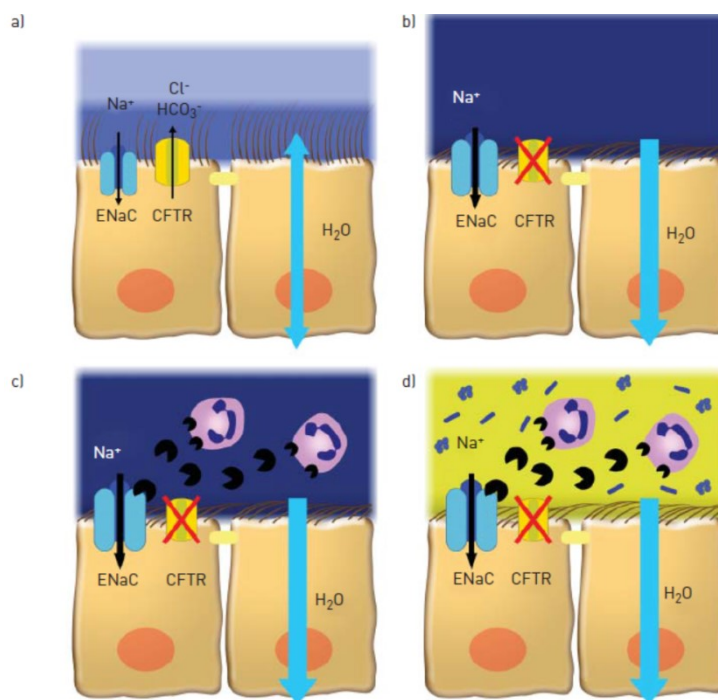
**Obrázek 1 – CFTR protein.** Protein se skládá ze dvou transmembránových domén, z nichž každá obsahuje 6 transmembránových segmentů. Na transmembránové domény navazují dvě domény vázající nukleotidy (NBD1 a NBD2). Propojení obou částí proteinu zajišťuje regulační doména. Na obrázku je označeno místo nejčastější mutace  $\Delta F508$ . Převzato a upraveno<sup>11</sup>.

Kromě zmíněných aniontů může být kanál propustný i pro další ionty ( $I^-$ ,  $F^-$ ,  $Br^-$ ), nebo též některé bioaktivní substráty (ATP, glutation)<sup>12,13</sup>. CFTR se též podílí na regulaci dalších kanálů epiteliálních buněk a inhibuje aktivitu ENaC („epithelial sodium channel“, epitelový sodný kanál) senzitivního na amilorid, což vede ke snížení reabsorpce  $Na^+$  v plicním epitelu<sup>14</sup>.

#### 1.1.4 Patofyziologie dýchacích cest

Povrch dýchacích cest je pokryt tenkou vrstvou kapaliny, tzv. ASL („airway surface liquid“, povrchová plicní kapalina), jejíž iontové složení hraje významnou roli ve vrozených mechanismech obrany proti mikrobiálním agens. ASL se skládá ze dvou vrstev. První je vrstva hlenu, která zachytává inhalované částice a patogeny. Druhou vrstvou je meziřasinková kapalina, která usnadňuje pohyb řasinek a zvlhčuje povrch, čímž podporuje uvolnění hlenu<sup>15</sup>. Zdravý epitel dýchacích cest má schopnost regulovat objem ASL reakcí na přítomné signály, které regulují absorpci  $Na^+$  a sekreci  $Cl^-$ . U zdravého jedince je pak výška ASL 7 mm, což odpovídá délce prodloužené řasinky. Tato autoregulace meziřasinkové kapaliny však nefunguje u CF. Selhání sekrece  $Cl^-$  způsobuje snížení objemu ASL, selhání regulace ENaC navíc zabraňuje kompenzační reakci. To vede k podstatnému snížení hladiny meziřasinkové kapaliny, přičemž dochází ke zploštění a zhroucení řasinek a snížení rychlosti transportu hlenu vedoucí k jeho obstrukci<sup>16–18</sup>. Dehydratovaný, statický hlen vyvolává zánět dýchacích cest a vytváří prostředí vhodné pro bakteriální infekci. S rozvojem neutrofilního zánětu dochází k uvolňování proteas (např. neutrofilní elastasy), které proteolytickým štěpením zvýší aktivitu ENaC, což vede

k dalšímu zhoršení hydratace povrchu dýchacích cest a mukociliární dysfunkci. Nedostatek sekrece  $\text{HCO}_3^-$  zprostředkované CFTR navíc způsobuje snížení pH ASL, které činí antimikrobiální proteiny, jako je lysozym a laktoferin, méně účinné a přispívá tak k narušení obrany dýchacích cest postižených CF proti bakteriální infekci (obrázek 2)<sup>19</sup>.



**Obrázek 2 - Důsledky dysfunkce CFTR v dýchacích cestách jedince s CF. a)** zdravý epitel dýchacích cest s funkčním CFTR, **b)** dysfunkce CFTR vede k narušení transportu iontů a vody a k hromadění hlenu, **c)** proteolytická aktivita vyvolaná zánětem zvyšuje aktivitu ENaC a dochází ke zhoršení dehydratace hlenu, **d)** snížená hladina pH povrchové plicní tekutiny snižuje účinnost antimikrobiálních proteinů a dochází ke snížení obrany proti infekci. Převzato a upraveno<sup>19</sup>.

#### 1.1.4.1 Změny glykosylace v dýchacích cestách a bakteriální infekce

Kromě výše zmíněných mechanismů přispívajících k větší náchylnosti k bakteriálním infekcím plic bylo prokázáno, že glykolipidy a glykoproteiny na plazmatické membráně CF buněk vykazují pozměněnou sialylaci, a že se glykokonjugáty se sníženou sialylací a zvýšenou fukosylací chovají jako adhezní receptory pro bakteriální patogeny u CF<sup>20,21</sup>.

Tomuto předpokladu odpovídá například fakt, že hlavní patogen CF pacientů, bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (PA), se prostřednictvím svých pilusů váže na asialylované glykokonjugáty, přesněji na receptor asialo-GM1 (gangliotetraosylceramid), který se ve zvýšené míře vyskytuje na povrchu CF epitelálních buněk. Vzhledem k tomu, že adheze patogenů k hostitelským tkáním nastává v počáteční fázi infekce, zvýšená interakce bakterií s epitelálními buňkami v dýchacím traktu pravděpodobně představuje kritický bod při kolonizaci patogenem<sup>21–23</sup>. Kolonizaci dýchacích cest mohou usnadnit i lektiny PA,

kteře hrají roli při vazbě bakterie na glykokonjugáty sliznice. Bylo navíc prokázáno, že jeden z těchto lektinů specifický pro fukosu (PA-IIL) může též inhibovat pohyb řasinek *in vitro*, čímž dojde k ovlivnění nespecifických obranných mechanismů dýchacích cest<sup>24</sup>.

Vysvětlení pro sníženou sialylaci není zcela jednoznačné. Jednou z možných představ je, že CFTR může hrát roli při okyselování intracelulárních kompartmentů, např. trans-Golgiho sítě, umožněním vstupu Cl<sup>-</sup> a udržení neutrálního náboje tím, že jsou do lumen těchto organel pumpovány protony. V důsledku ztráty CFTR a vodivosti by pak došlo ke zvýšení pH trans-Golgiho sítě, čímž by následně došlo ke snížení aktivity sialyltransferas<sup>25</sup>. Další studie však ukázaly, že trans-Golgiho síť nemusí být u CF alkalizována, ale může tomu být naopak. Ukázalo se, že trans-Golgiho síť v CFTR mutovaných buňkách opravdu vykazuje abnormální pH, avšak nižší, a tedy kyselější, než je obvyklé. Na základě toho bylo též prokázáno, že korekce pH trans-Golgiho sítě může zvrátit sníženou sialylaci u CF a omezit adhezi PA. Oba tyto názory však spojují defekt v CFTR s patologií plic a vedou ke stejnému závěru, že aktivita sialyltransferas je u CF narušena v důsledku abnormálního pH v trans-Golgiho síti<sup>26</sup>.

Jedním z dalších faktorů, které přispívají ke kolonizaci PA v dýchacích cestách postižených CF, je nadprodukce nadměrně viskózního hlenu a ztížená mukociliární clearance zachycených mikrobů<sup>27</sup>. Vysoce zastoupenými proteiny ve sputu jsou muciny. Tyto vysokomolekulární glykoproteiny jsou součástí vrozené imunity dýchacích cest. Apomuciny (peptidové části mucinů) jsou kódovány alespoň 6 různými mucinovými geny, přičemž některé z nich jsou indukovány bakteriálními produkty. Muciny přítomné v lidském dýchacím traktu jsou vysoce glykosylované a obsahují až několik set sacharidových řetězců. Vzhledem k široké rozmanitosti těchto struktur jsou tyto glykoproteiny zapojeny do interakce s mikroorganismy a jsou též velmi důležité při ochraně sliznice dýchacích cest. Při CF jsou muciny dýchacích cest nadměrně sulfatované a vysoce sialylované, přítomná je též vysoká exprese sialylovaných a sulfatovaných determinant Lewis<sup>X</sup>. Tyto determinanty jsou potenciálními místy pro vazbu PA prostřednictvím fimbriálních a flagelárních adhesinů a lektinů přítomných mimo pili. Do biosyntézy těchto mucinů jsou zapojeny sulfo- a glykosyltransferasy, jejichž exprese je zvýšena přítomností TNF $\alpha$  (faktor nádorové nekrózy  $\alpha$ ). Zánět dýchacích cest tedy může vyvolat expresi některých mucinových genů a také některých sulfo- a glykosyltransferas, čímž dochází k modifikaci glykosylace těchto molekul. Nedávno bylo například zjištěno, že PA pigment pyocyanin moduluje glykosylaci sialyl-Lewis<sup>X</sup> tak, že zvýší glykosylaci

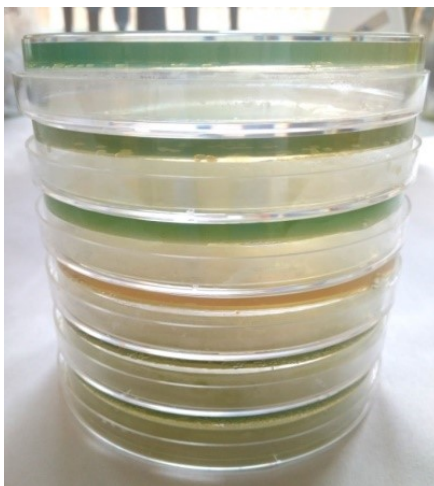
mucinů, čímž indukuje vhodné prostředí pro chronickou kolonizaci plic postižených CF<sup>28–30</sup>.

Bakteriální infekce, nejčastěji způsobené PA, jsou pro pacienty s CF kritické. Následkem akutních exacerbací a zjizvení tkání při chronických infekcích může být až plicní selhání, které vede k vysoké morbiditě a mortalitě pacientů s CF<sup>27</sup>.

## 1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou aerobní, gramnegativní, tyčinkové mikroorganismy (0,5-1  $\mu\text{m}$  na 1,5-5  $\mu\text{m}$ ) s jedním či několika polárními bičíky. V přírodě jsou zastoupeny hojně, běžně se vyskytují v půdách, povrchových vodách (včetně oceánu) a na rostlinách. Mohou se množit ve vlhkém prostředí obsahujícím i jen stopové množství živin, proto se jim naneštěstí daří v i nemocničním prostředí na vlhkých místech, jako jsou např. dřezy, toalety, respirační a dialyzační vybavení, či dokonce dezinfekční prostředky. Z lékařského hlediska je nejdůležitějším druhem v této skupině *Pseudomonas aeruginosa*, která způsobuje primárně oportunní infekce, hlavně tedy u lidí s imunitními defekty<sup>31</sup>. Vysokému riziku jsou vystaveni pacienti s neurotropení. Mezi hlavní infekce způsobené tímto patogenem patří např. pneumonie u pacientů s CF či s umělou plicní ventilací, infekce pooperačních ran či ran vzniklých při popáleninách.

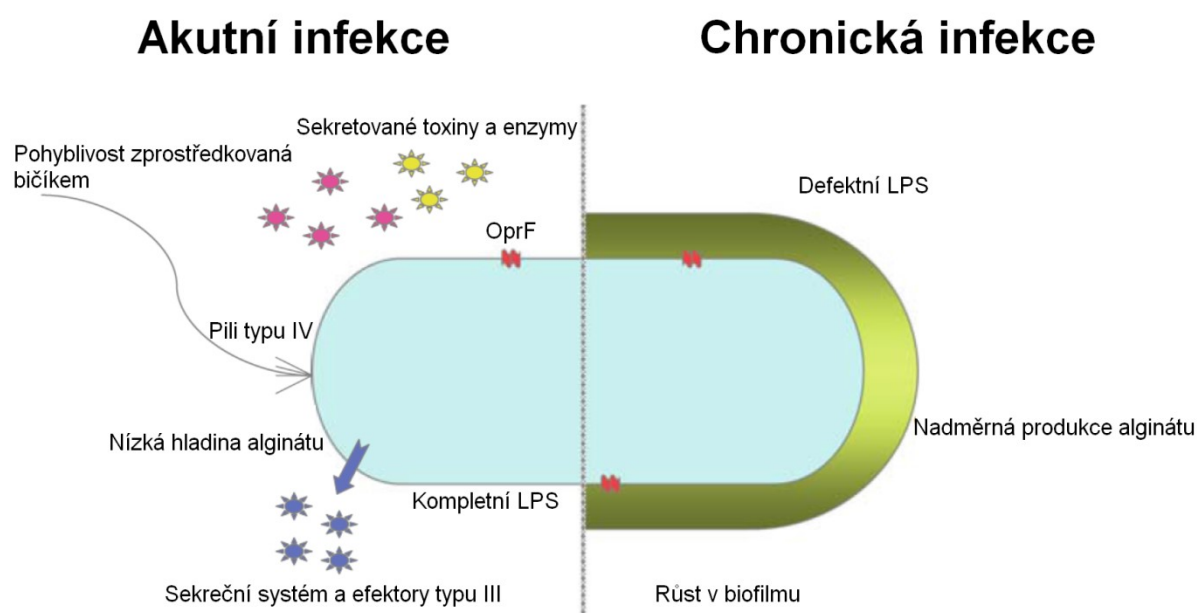
Pro kultivaci PA je nutný volný kyslík, který slouží jako koncový akceptor elektronu v dýchacím řetězci. PA produkuje dva typické pigmenty, žlutozelený fluorescenční pyoverdin a zelenomodrý pyocyanin (obrázek 3).



**Obrázek 3 - Agarové plotny s kulturou PA.** V závislosti na množství kolonií se agar zbarví typickými pigmenty PA (pyocyanin a pyoverdin).

PA má jako součást své buněčné stěny vnější membránu, jejíž stavba je odpovědná za přirozenou odolnost vůči mnoha druhům antibiotik. Antibiotika používaná k léčbě PA infekcí jsou karboxypeniciliny, acylureidopeniciliny, aminoglykosidy, cefalosporiny skupiny 3b a karbapenemy. U závažných infekcí je indikována kombinace aminoglykosidu s betalaktamem. Kvůli časté rezistenci je nezbytné provádět testy citlivosti.

Některé kmeny PA mohou produkovat viskózní extracelulární vrstvu hlenu a jsou pak označovány jako mukoidní<sup>32</sup>. Kmeny získané od pacientů s CF v počátku infekce mukoidní nejsou a díky tomu jsou ještě citlivé na většinu výše zmíněných antibiotik. Tyto kmeny produkují řadu virulentních faktorů, které přispívají k onemocnění plic u CF. V průběhu času, pod tlakem antibiotik a oxidativního stresu, se PA přizpůsobuje plicím postiženým CF a díky svému vysoce mutabilnímu genotypu podléhá genetickým i fenotypovým změnám (obrázek 4). Tak dochází k přeměně na mukoidní fenotyp, ztrátě motility a strukturálním změnám v lipopolysacharidu (LPS), přičemž se kolonie stávají drsné a bakterie mají sníženou virulenci<sup>33</sup>.



**Obrázek 4 – Znázornění fenotypových rozdílů PA v různých fázích infekce.** Fenotypy charakteristické pro izoláty PA z akutních infekcí jsou podobné těm, které se vyskytují v životním prostředí a při počáteční infekci CF pacientů. Při chronické infekci dochází k fenotypovým změnám. Převzato a upraveno<sup>34</sup>.

Dalším důležitým znakem chronické infekce plic je tvorba bakteriálního biofilmu. Tímto způsobem se bakterie vyhýbají ciliární clearance a fagocytóze a jsou též relativně rezistentní vůči antibiotikům. PA používá systém založený na extracelulárních chemických



signálech, které ovlivňují genovou expresi v závislosti na hustotě buněk, čímž podporuje počáteční tvorbu mikrokolonií vedoucí ke vzniku biofilmů vázaných na alginát<sup>35</sup>. Mukoidní fenotyp PA je spojen s rychlejším poklesem funkce plic<sup>36</sup>.

### 1.2.1 Faktory virulence

PA disponuje celou řadou faktorů virulence, včetně adhesinů, toxinů a enzymů. Navíc využívá sekreční systém typu III, který je zvláště účinný při injekci toxinů do hostitelské buňky<sup>37</sup>.

Prvním krokem pro vypuknutí infekce je adheze bakterie na povrch epiteliálních buněk zprostředkovaná povrchovými strukturami PA, tzv. adhesiny, kam patří pili typu IV, bičík, LPS a alginát. Bičík a pili zprostředkovávají motilitu bakterie, lipid A přítomný v LPS je odpovědný za endotoxinovou aktivitu. Alginát je mukoidní exopolysacharid, který tvoří na povrchu bakterie obal (kapsuli), který slouží jako ochrana před fagocytózou a působením antibiotik<sup>38</sup>.

Virulenci PA ovlivňuje i velké množství sekretovaných enzymů a toxinů, jako např. exotoxin A, exoenzym S a T, elastasy, proteasy, fosfolipasa C, pyocyanin a pyoverdin. Exotoxin A je jedním z nejvýznamnějších faktorů virulence patogenních kmenů PA. Tento toxin blokuje prodlužování peptidového řetězce, čímž narušuje syntézu proteinů. S největší pravděpodobností též přispívá k poškození tkáně při plicních infekcích. Exoenzymy S a T jsou extracelulární toxiny. Když dojde k interakci proteinů vyloučených sekrečním systémem typu III s eukaryotickou buňkou, dochází k poškození epiteliálních buněk v důsledku změny struktury aktinu, což vede k usnadněnému šíření bakterie, invazi tkání a nekróze. Degradace elastinu se účastní dvě elastasy, serinová (LasA) a zinková metaloproteasa (LasB), které působí synergicky. Důsledkem jejich působení je poškození tkání obsahujících elastin, poškození plicního parenchymu a vznik hemoragických lézí. Kromě toho mohou tyto enzymy degradovat složky komplementu a inhibovat chemotaxi a funkci neutrofilů. Všechny tyto změny vedou k rozšíření infekce a poškození tkání při akutních infekcích. Protilátky proti těmto elastasám jsou pak charakteristickým znakem chronické infekce. Důsledky působení alkalické proteasy jsou velmi podobné. Fosfolipasa C je teplotně labilní hemolysin, který usnadňuje destrukci tkáně štěpením lipidů a lecitinu. I typické pigmenty PA se řadí mezi virulentní faktory. Pyoverdin je siderofor, který váže ionty železa, které se účastní dějů v metabolismu hostitele. Reguluje navíc sekreci dalších faktorů virulence včetně exotoxinu A. Pyocyanin katalyzuje produkci

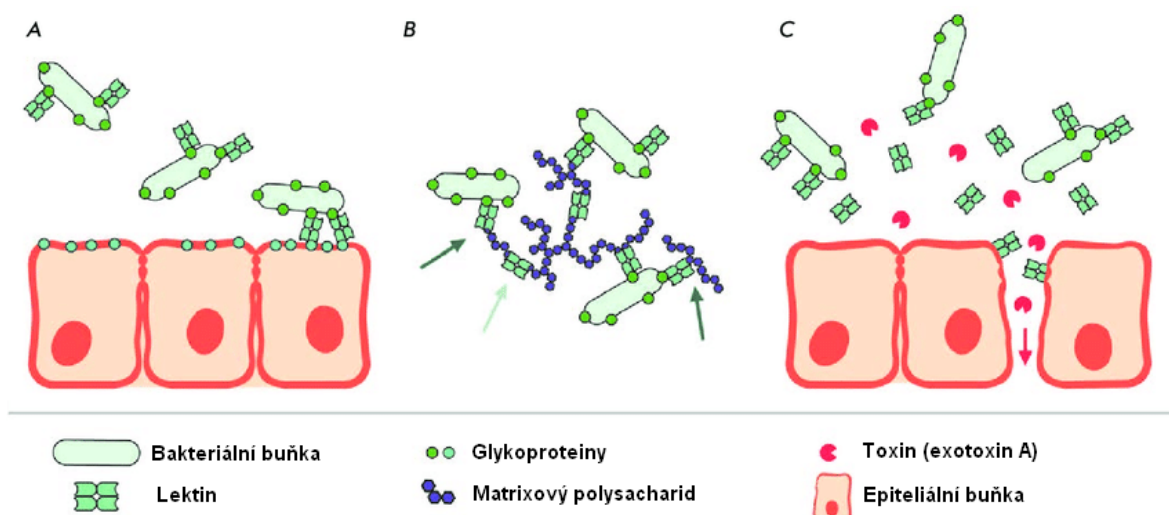
superoxidu a peroxidu vodíku, toxických forem kyslíku. Působí i na imunitní systém, neboť stimuluje uvolňování interleukinu-8, který ve zvýšené míře přitahuje neutrofile, tedy buňky akutní fáze zánětu<sup>31,39</sup>.

### 1.2.2 Lektiny PA

Lektiny představují zvláštní třídu proteinů, které specificky rozpoznávají a váží sacharidy. Mají schopnost aglutinovat červené krvinky, což se využívá pro jejich detekci<sup>40</sup>.

Z bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byly izolovány dva lektiny: PA-IL (PA lektin I, též lektin A či LecA) a PA-IIL (PA lektin II, též lektin B či LecB). Tyto dva lektiny se liší svou specifitou pro vazbu sacharidů. PA-IL váže D-galaktosu a její deriváty:  $\alpha$ -D-galaktosa >  $\beta$ -D-galaktosa > D-N-acetylgalaktosamin. PA-IIL váže: L-fukosa > D-manosa (a manan) > L-galaktosa > D-fruktosa<sup>41</sup>. Oba tyto lektiny mají čtyři podjednotky (velikost podjednotky - PA-IL: 12,76 kDa; PA-IIL: 11,73 kDa), z nichž každá obsahuje vápenaté ionty a vazné místo pro sacharid<sup>42</sup>. Hladiny lektinů v extraktech PA se v průběhu růstu kultury mění a závisí též na složení kultivačního média. Vysoká a dominantní aktivita PA-IL je přítomná v extraktech bakterií kultivovaných v médiích obsahujících soli a kvasinkový extrakt, zatímco vysokou aktivitu PA-IIL lze získat v extraktech bakterií kultivovaných v růstovém médiu („nutrient broth“) obsahujícím pepton a hovězí extrakt. Přidání antibiotik (např. streptomycinu) naopak produkci lektinů potlačuje, čímž jsou následně ovlivněny i subkultury bakterie kultivované bez antibiotik<sup>43</sup>. Produkce obou lektinů je též ovlivněna fází růstu bakteriální kultury. Ve vzorcích kultury odebrané v exponenciální fázi růstu nebyl při studiu exprese lektinů detekován PA-IL ani PA-IIL, během přechodu do stacionární fáze byla však při vysoké hustotě buněk pozorována produkce obou těchto lektinů<sup>44</sup>.

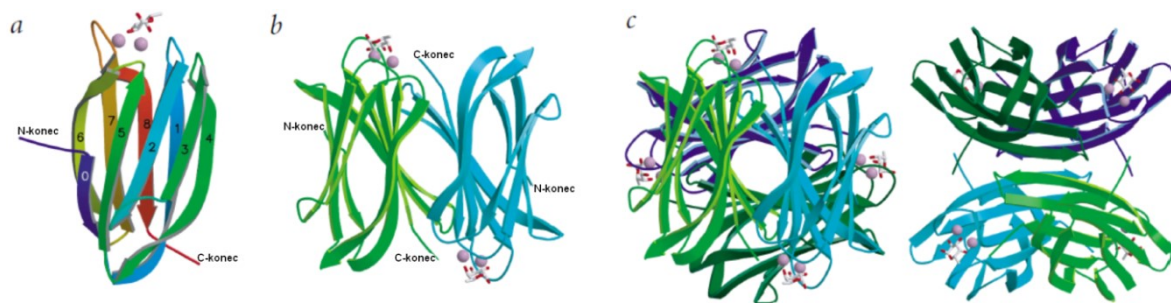
Lektiny PA přispívají k patogenitě bakterie a vykazují různé cytotoxické účinky na buňky plicního epitelu. Hrají roli jako adhesiny při vazbě bakterií na cílové buňky a molekuly, s jejichž sacharidovými komponenty specificky reagují, čímž usnadňují adhezi bakterií na sliznici dýchacích cest. Dále přispívají ke tvorbě biofilmu, spolupracují s některými agresivními virulentními faktory patogenu (např. exotoxin A, proteasy), interagují též s jinými bakteriemi v okolí a napomáhají tak k jejich zániku<sup>42</sup>. Schématické shrnutí úlohy lektinů je zobrazeno na obrázku 5 na straně 11.



**Obrázek 5 - Schematické zobrazení navrhovaných funkcí lektinů PA.** (A) adheze bakterie na hostitelské buňky; (B) propojení bakteriálních buněk a matrixových polysacharidů a zesílení těchto polysacharidů vedoucí ke tvorbě biofilmu; (C) narušení epitelové bariéry a zvýšení permeability pro další virulentní faktory. Převzato a upraveno<sup>45</sup>.

#### 1.2.2.1 PA-IIL

Jak již bylo zmíněno, PA-IIL má tetramerní strukturu (obrázek 6). Vazba fukosy k PA-IIL je zprostředkována dvěma  $\text{Ca}^{2+}$ . Oba ionty mají klasickou koordinaci se sedmi ligandy a jejich vazba je zprostředkována jak proteinem, tak vázaným sacharidem, což je běžné u lektinů typu C.



**Obrázek 6 - Struktura komplexu PA-IIL s fukosou.** Fukosa je zobrazena pomocí tyčinkového modelu, vápenaté ionty pomocí modelu kuličkového. (a) monomer PA-IIL. (b) dimer s řetězcem A (modře) a řetězcem B (zeleně). (c) dva různé pohledy na tetramer PA-IIL. Převzato a upraveno<sup>46</sup>.

Na rozdíl od většiny lektinů, které vykazují pouze slabou afinitu k monosacharidovým ligandům (asociační konstanta řádově milimolární), má interakce fukosy a PA-IIL asociační konstantu v řádu mikromolární (2,9  $\mu\text{M}$ ). Neobvyklé interakce tvořené dvěma ionty  $\text{Ca}^{2+}$ , vedlejšími řetězci aminokyselin koordinujícími tyto ionty a hydroxylovými

skupinami fukosy jsou základem pro takto silnou afinitu. Preferovaným ligandem pro PA-IIL jsou Lewis<sup>a</sup> struktury<sup>46,47</sup>.

Starší studie ukázaly, že je PA-IIL umístěn hlavně v cytoplazmě planktonických buněk a jejich menší frakce jsou potom umístěny na cytoplazmatické a vnější membráně a v periplazmatickém prostoru<sup>48</sup>. Tato zjištění však ztěžují vysvětlení cytotoxických a adhezivních vlastností zprostředkovaných tímto lektinem. Byla proto věnována větší pozornost studiu jeho subcelulární lokalizace v planktonických buňkách PA a buňkách PA tvořících biofilm. Výsledky studie dokazují, že u obou typů buněk byl PA-IIL přítomen ve vnější membráně PA, i když jako protein postrádá strukturní charakteristiky membránových proteinů. S povrchem bakteriální buňky je spojen prostřednictvím vazby na sacharidové ligandy, jakožto jakýchsi receptorů pro tento lektin. Tato zjištění dokazují, že povrchově exponovaný PA-IIL může zprostředkovat adhezi PA k buňkám stejného či odlišného typu, což umožňuje nejen kolonizaci hostitelských tkání, ale též tvorbu mono- či vícedruhových biofilmů. Jak již bylo zmíněno dříve, buňky plicního epitelu pacientů s CF vykazují zvýšenou fukosylaci. Právě na tyto fukosylované glykoproteiny se pak PA může prostřednictvím PA-IIL vázat, což napomáhá rozvoji chronických infekcí dýchacích cest pacientů s CF. Tento lektin tedy přispívá k patogenitě bakterie u pacientů s CF a představuje zajímavý terapeutický cíl<sup>49</sup>.

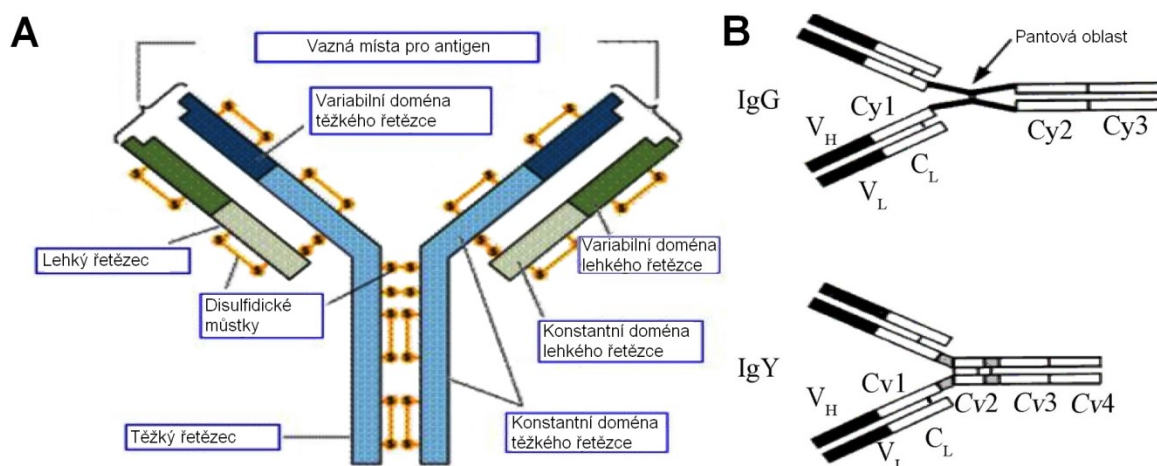
### 1.3 Potenciální anti-PA-IIL inhibitory

PA bývá často rezistentní na mnohá používaná antibiotika, proto se věnuje pozornost vývoji nových sloučenin s účinkem odlišným od tradičních antibiotik, které potlačují růst mikroorganismů, nebo je přímo zabíjejí. Tyto nové druhy sloučenin by měly inhibicí virulentních faktorů PA a tvorby biofilmu snižovat schopnost patogenu kolonizovat a poškodit tkáň hostitele. V posledních letech bylo navrženo velké množství různých inhibitorů PA-IIL, z nichž většina obsahuje příslušné sacharidy jako afinní ligandy. K těmto inhibitorům se řadí monosacharidové deriváty, přírodní glykoproteiny a polysacharidy, multivalentní glykoklastry a dendrimery různé chemické povahy. Mimo tyto sloučeniny obsahující sacharidy byly testovány i glykomimetické peptidy<sup>45</sup>. Odlišným přístupem pro hledání inhibitorů PA-IIL, které nevyužívají jeho afinitu k sacharidům, ale cílí na vazebnou afinitu proteinu, je využití specifických protilátek<sup>50</sup>.

### 1.3.1 Slepí protilátky

Imunitní systém zajišťuje ochranu organismu před napadením mikroorganismy, cizorodými látkami či maligními buňkami. Tento obranný systém se u obratlovců dělí na dvě části: vrozený (neadaptivní a nespecifický) a získaný (adaptivní a specifický). Získaný imunitní systém se potom dělí na humorální a buněčnou imunitu, která je zprostředkována primárně T- a B- lymfocyty<sup>51</sup>. Imunitní systém slepic sestává z primárních orgánů (brzlík a Fabriciova burza) a sekundárních orgánů (slezina, lymfatické uzliny, Harderova žláza, kostní dřeň a lymfoidní tkáň zažívacího traktu). Zdrojem T- a B-buněk je kostní dřeň. Místem diferenciací kmenových buněk do B-buněk je Fabriciova burza, T-buňky diferencují v brzlíku. Ve slezině proliferují plazmatické buňky a jsou zde umístěny paměťové B-buňky. Plazmatické buňky jsou leukocyty specializované na produkci protilátek, vznikají diferenciací B-buněk.

Ptáci mají tři třídy imunoglobulinů (Ig), které jsou analogické savcím IgA, IgM a IgG. Dříve se ptačí IgY přítomné v séru a vaječném žloutku též označovaly jako IgG, neboť mají podobnou funkci jako u savců. Toto označení však bylo nevhodné z důvodu strukturálních rozdílů IgG a IgY. Molekula IgY se skládá ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců. Těžký řetězec obsahuje čtyři konstantní domény (IgG pouze tři) a jednu variabilní doménu. Molekulu Ig lze rozštěpit na 3 fragmenty pomocí omezeného štěpení proteasou papain. Tento enzym štěpí molekulu protilátky na amino-terminálním konci disulfidických vazeb spojujících dva těžké řetězce. Tak dojde k uvolnění dvou identických fragmentů se schopností vázat antigen, tzv. Fab fragmenty („Fragment antigen binding“, fragment vázající antigen). Dále vzniká fragment, který antigen neváže a díky jeho snadné krystalizaci se označuje jako Fc („Fragment crystallizable“, krystalizující fragment)<sup>52,53</sup>. Hmotnostní spektrometrií byla stanovena průměrná molekulová hmotnost IgY molekuly 167 250 Da (IgG má přibližně 160 kDa), těžkého řetězce 65 105 Da, lehkého řetězce 18 660 Da a Fab fragmentu 45 359 Da. V porovnání s IgG má IgY vyšší molekulovou hmotnost těžkého řetězce, zatímco u lehkého řetězce je tomu naopak<sup>54</sup>. Dalším rozdílem je tzv. pantová oblast, která je u IgY kratší a méně flexibilní (obrázek 7, str. 14). IgY jsou též více glykosylovány, neboť obsahují dvě potenciální N-glykosylační místa. Toto glykosylační schéma je více analogické savcím IgE, které s IgY vykazují značnou strukturní podobnost. Pro IgY jsou typické vysoce manosové typy glykanů<sup>55</sup>.



**Obrázek 7 - Struktura IgG a IgY.** (A) Obecně se struktura protilátky skládá ze dvou lehkých a dvou těžkých polypeptidových řetězců. (B) Těžký řetězec obsahuje u obou Ig jednu variabilní doménu a tři (IgG) nebo čtyři (IgY) konstantní domény. Pantová oblast je u IgG delší a více flexibilní. Převzato a upraveno<sup>56</sup>.

Oproti savčím protilátkám mají IgY hned několik výhod. Z etických důvodů je izolace protilátek ze slepičích vajec pro zvíře mnohem příznivější, neboť zvíře nemusí podstupovat invazivní odběr krve či dokonce usmrcení, což jsou nejčastější postupy při získu savčích protilátek. V případě IgY jsou tyto postupy nahrazeny sběrem vajec. Využití nosnic pro produkci Ig též znamená snížení počtu potřebných zvířat, neboť ve žloutku je vysoká koncentrace protilátek (až 100 mg), a pokud přihlídneme k faktu, že nosnice produkuje přibližně 20 vajec za měsíc, můžeme takto získat až 2 g protilátky měsíčně<sup>57,58</sup>. Srovnání vlastností IgY a IgG je uvedeno v tabulce 1.

**Tabulka 1 - Porovnání IgG a IgY.** Převzato a upraveno<sup>58,59</sup>.

	<b>Savčí IgG</b>	<b>Ptačí IgY</b>
Získ protilátek	invazivní	neinvazivní
Množství protilátek	200 mg IgG/odběr (40 ml krve)	50-100 mg IgY/vejce (5-7 vajec/týden)
Množství protilátek/měsíc	200 mg	~ 1 500 mg
Množství specifické protilátky	~ 5 %	2-10 %
Vazba proteinu A/G	ano	ne
Interference se savčími IgG	ano	ne
Interference s revmatoidním faktorem	ano	ne
Aktivace savčího komplementu	ano	ne

IgY jsou stabilní i při vyšších teplotách (až 60 °C) a při pH ~ 4-11. Při skladování s přídavkem antimikrobiálních činidel (NaN<sub>3</sub>, thimerosal či gentamicin) při teplotě 4 °C lze IgY uchovat několik měsíců až let.

Vývoj a produkci protilátek po imunizaci však nelze příliš předvídat. Imunitní reakci imunizované slepice ovlivňují nejméně čtyři proměnné: antigen (molekulová hmotnost a dávka), typ použitého adjuvans, způsob aplikace a samotné zvíře (podmínky chovu, věk, plemeno, snášení vajec)<sup>60</sup>.

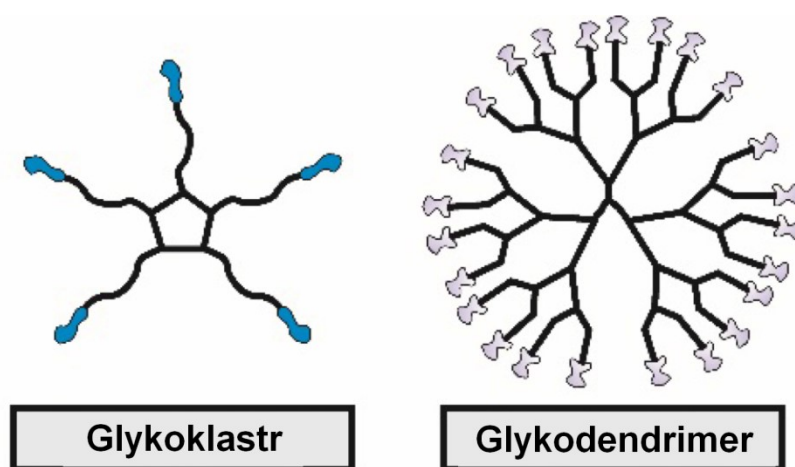
Profylaktická léčba specifickými IgY se však zdá být slibnou alternativou či doplňkem antibiotik pro prevenci infekcí způsobených PA u pacientů s CF. Klinické studie ukázaly, že orálně podávané IgY proti PA vykazují protektivní efekt bez negativních vedlejších účinků, a to dokonce po dobu několika let<sup>61,62</sup>.

### 1.3.2 Multivalentní inhibitory na bázi sacharidů

Kromě využití přírodních anti-adhezivních sloučenin se věnuje velká pozornost výzkumu zaměřenému na produkci syntetických glykoklastrů navržených tak, aby vykazovaly vyšší afinitu k bakteriálním lektinům a nahradily tak sloučeniny přírodního původu<sup>42</sup>. Omezená síla vazby mezi sacharidy a lektiny může být zesílena multivalencí lektinů i jejich ligandů. Pokud je molekula či molekulový komplex multivalentní, znamená to, že obsahuje několik identických vazebných míst. Lektiny mohou být například organizovány do homomultimerních proteinových komplexů, zatímco glykoproteiny, na které se lektiny váží, mohou nést několik identických glykanových řetězců. Multivalence potom umožňuje významné zvýšení afinity a specifity interakce mezi glykany a lektiny pomocí následujících mechanismů: a) schopnost současně vázat několik epitopů multivalentního ligandu pomocí několika míst multivalentního lektinu (tzv. chelatační interakce); b) vysoká lokální koncentrace epitopů v daném místě (přítomnost několika epitopů na jedné molekule ligandu), které může lektin vázat, i když současná vazba několika epitopů není možná - pokud dojde k disociaci komplexu lektinu s jediným epitopem, má vysokou pravděpodobnost vazby na jiný identický epitop v jeho blízkosti<sup>63,64</sup>.

Glykoklastry (nebo také klastrové glykosidy) mohou být strukturně považovány za sloučeniny mimikující oligosacharidy přirozeně se vyskytujících glykokonjugátů. Jedná se o multivalentní glykokonjugáty, které jsou složeny ze skeletu, který neobsahuje repetitivní jednotky. Díky těmto strukturním charakteristikám lze odlišit tyto sloučeniny se spíše

nízkovalenční stavbou od „pravých“ glykodendrimerů. Jako jádrové molekuly jsou u glykoklastrů používány např. rozvětvené aromatické či alifatické skelety, kalixareny, cyklické peptidy, porfyriny či cyklodextriny. Takto vzniknou malé multivalentní glykokonjugáty, které mají výrazně zvýšenou aviditu v porovnání s odpovídajícími monovalentními sacharidy. Většina takových skeletů byla též použita pro konstrukci komplexnějších glykodendrimerů. Jako glykodendrimer (z řeckého *dendros* = strom) je označována rozvětvená struktura, která vychází z centrální multifunkční jádrové jednotky, na níž jsou navázány „větve“ s terminálními sacharidovými epitopy. Porovnání struktury glykoklastru a glykodendrimeru je zobrazeno na obrázku 8.



**Obrázek 8 - Schematické znázornění struktur multivalentních glykokonjugátů. Porovnání struktury glykoklastru a glykodendrimeru. Převzato a upraveno<sup>65</sup>.**

Efektivita a specifita vazby multivalentní sloučeniny lektinem závisí nejen na hustotě epitopů, ale též na povaze jádrové jednotky a geometrickém uspořádání daného komplexu<sup>66,67</sup>. Hledání ligandů s vysokou afinitou pro PA-III iniciovalo syntézu několika typů sloučenin obsahujících fukosu, např. na bázi kalixarenu či pentaerythritolu<sup>68</sup>.

Tato práce je zaměřena na studium anti-PA-III slepičích protilátek a jejich schopnost ovlivnit adhezi PA na plicní epitelální buňky, která byla též porovnána s multivalentními inhibitory na bázi fukosy.



## 2 Cíl práce

Cílem práce je ověřit schopnost slepičích protilátek specifických proti lektinu PA-IIL snižovat adheenci *Pseudomonas aeruginosa* (ST 1763) na plicní epitelální buňky (CuFi-1, NuLi-1) a porovnat jejich efekt s efektem multivalentních inhibitorů PA-IIL na bázi fukosy. Pro splnění tohoto cíle je třeba řešit následující dílčí úkoly:

- izolovat IgY frakce z vaječných žloutků získaných před imunizací a po imunizaci vybrané slepice antigenem PA-IIL  $\Delta$ G/fuc
- izolovat specifické anti-PA-IIL protilátky ze směsných frakcí metodou afinitní chromatografie
- prokázat schopnost IgY frakcí rozpoznat rekombinantní PA-IIL metodou ELISA
- ověřit přítomnost PA-IIL v kultuře PA a studovat jeho expresi v závislosti na různých podmínkách kultivace pomocí metody Western blot s následnou imunodetekcí specifickými slepičími protilátkami
- testovat a porovnat vliv vybraných frakcí IgY od různých slepic na adheenci PAK k buňkám plicního epitelu
- ověřit specifitu a reprodukovatelnost specifických frakcí protilátek proti PA-IIL
- zjistit, zda počet subkultivací ovlivňuje chování použitých buněčných linií v *ex vivo* modelu pro testování adherence PA
- porovnat na buněčném modelu efekt anti-PA-IIL protilátek s efektem multivalentních inhibitorů PA-IIL na bázi fukosy
- určit nejefektivnější inhibiční koncentraci multivalentních inhibitorů.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Použité přístroje a materiál

#### 3.1.1 Přístroje

analytické váhy DV215CD

aparát pro horizontální přenos Fast Blot B43

autokláv Varioklav<sup>®</sup>

centrifuga 5415 R

centrifuga HERMLE Z 383 K

centrifuga Hettich Universal 320 R

centrifuga K70D

CO<sub>2</sub> inkubátor MCO-170AIC

elektroforetická aparatura Mini-PROTEAN<sup>®</sup>

Tetra Cell

inkubátor Raven 2

inkubátor s funkcí třepání Multitron Pro

inkubátor s funkcí třepání ES-60

laboratorní rotátor LR-03

laminární box BIO 126

laminární box MB 120

magnetická míchačka KMO 2 basic

mikroskop Motic AE31

mikroskop Nikon ECLIPSE TE2002-U

s programem NIS-Elements AR 2.30

mikrovlnný autokláv Microjet

mini centrifuga Spectrafuge<sup>™</sup>

orbitální třepačka SHO-2D

pH metr HI-2211

pipetovací nástavec Pipetus

předvážky 440-35A

rolovací třepačka MX-T6-S

Ohaus, Švýcarsko

Biometra, Německo

H+P Labortechnik GmbH, Německo

Eppendorf, USA

HERMLE LaborTechnik, Německo

Hettich Zentrifugen, Německo

Janetzki, Německo

Panasonic Healthcare Co., Japonsko

Bio-Rad, USA

LTE Scientific, UK

Infors HT, Švýcarsko

MIUlab, Čína

Chemos CZ, ČR

Labox, ČR

Labox, ČR

IKA, Čína

Motic, Německo

Nikon, Japonsko

The Rodwell Autoclave Company, UK

Labnet, USA

Witeg, Německo

Hanna Instruments, UK

Hirschmann, Německo

KERN, Německo

Scilogex, USA

sonikátor Sonopuls HD 3100	Bandelin, Německo
spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro s programem i-control	Tecan, Švýcarsko
spektrofotometr ELISA Sunrise Remote	Tecan, Švýcarsko
spektrofotometr HP 8453 E	Hewlett-Packard, USA
spektrofotometr Spektromom 195 D	MOM Budapest, Maďarsko
spektrofotometr Spekol 11	Carl-Zeiss, Německo
termoblok MINIB-100 Mini Dry Bath	MIUlab, Čína
zdroj pro elektroforézu	Bio-Rad, USA

### 3.1.2 Materiál

2-merkaptoethanol	Fluka, Švýcarsko
4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate	Sigma, USA
akrylamid, bisakrylamid	Sigma, USA
Anti-Chicken IgY (IgG)-Alkaline Phosphatase	Sigma, USA
BCIP/NBT Color Development Substrate	Promega™, USA
BEGM™ Bronchial Epithelial Cell Growth Medium BulletKit™	Lonza, Švýcarsko
Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad, USA
bromfenolová modř	Sigma, USA
BSA fraction V	Merck, Německo
buněčné linie CuFi-1 a NuLi-1	ATCC®, USA
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	PENTA, ČR
cOmplete™ ULTRA tablety	Sigma, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma, USA
Collagen type IV from human placenta	Sigma, USA
Cyanogen bromide activated Sepharose 4B	Sigma, USA
destičky CellBind® 24 jamek	Corning, USA
D-glukosa monohydrát	Lach:Ner, ČR
diethylamin	Sigma, USA
dimethylsulfoxid	Aplichem, Německo
dodecylsírán sodný (SDS)	Sigma, USA
D-Tube™ Dialyzer Mini-Maxi (6-8 kDa, 12-14 kDa) dialyzační tuby	Novagen®, USA
ethanol	Lach:Ner, ČR
fetální bovinní sérum (FBS)	Lonza, Švýcarsko
glycin	Sigma, USA
guanidin/HCl	Sigma, USA
HCl	Lach:Ner, ČR
Immuno Clear Standard Modules (F16, PolySorp)	Thermo Fisher Scientific, USA

isopropylalkohol	PENTA, ČR
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Lach:Ner, ČR
KOH	Lach:Ner, ČR
kvasinkový extrakt	Thermo Scientific™ Oxoid™, UK
kyselina octová	Lach:Ner, ČR
L-fukosa	Lach:Ner, ČR
LHC-9 medium	Gibco™ Invitrogen, UK
lysozym z vaječného bílku (lyofilizát)	Merck, Německo
methanol	Lach:Ner, ČR
$\text{MgCl}_2$	Lach:Ner, ČR
$\text{MgSO}_4$	Lach:Ner, ČR
$\text{NaCl}$	Lach:Ner, ČR
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Lach:Ner, ČR
$\text{NaHCO}_3$	Lach:Ner, ČR
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Lach:Ner, ČR
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	Lach:Ner, ČR
$\text{NaOH}$	Lach:Ner, ČR
$\text{NaN}_3$	Fluka, Německo
$\text{NH}_4\text{Cl}$	Lach:Ner, ČR
nitrocelulosová membrána (0,2 $\mu\text{m}$ )	Bio-Rad, USA
PBS tablety (1 do 500 ml $\text{dH}_2\text{O}$ ; pH 7,45)	Gibco™ Invitrogen, UK
penicilin G sodná sůl	DUCHEFA BIOCHEMIE B.V, Holandsko
peroxodisíran amonný (APS)	Sigma, USA
Pierce™ Microplate BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, USA
PKH 26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane labeling	Sigma, USA
PKH 67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit for general Cell Membrane Labeling	Sigma, USA
polyakrylamid	Sigma, USA
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Sigma, USA
purifikovaný agar	Thermo Scientific™ Oxoid™, UK
PVDF membrána Immobilon® -P <sup>SQ</sup> (0,2 $\mu\text{m}$ )	Merck, Německo

streptomycin sulfát	SERVA Electrophoresis GmbH, Německo
tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, USA
Tris-base	Sigma, USA
Tris-HCl	Sigma, USA
trypanová modř 0,4%	Sigma, USA
Trypsin-EDTA Solution	Sigma, USA
trypton	Thermo Scientific™ Oxoid™, UK
TWEEN® 20	Fluka, Německo
Whatman filtrační papíry (Grade 3)	Sigma, USA
zmrazovací kontejner Nalgene® Cryo 1°C “Mr. Frosty”	Thermo Fisher Nalgene®, USA

#### **Testované frakce slepičích protilátek:**

2A1, 2A2, 2N1, 2N2	připravené Bc. P. Pomazalem (2017)
3S1	připravená Mgr. B. Bláhovou (2009)

#### **Rekombinantně připravené antigeny:**

PA-IIL, PA-IIL ΔG/fuc, inaktivovaný PA-IIL	výzkumná skupina prof. RNDr. M. Wimmerové, Ph.D., PřF MU, Brno
--	--

#### **Testované syntetické multivalentní inhibitory na bázi fukosy:**

CSM-539	výzkumná skupina prof. Anikó Borbás, Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Debrecen
XIIIc, XIVc	výzkumná skupina prof. Ing. J. Moravcové, CSc., ÚCHPL VŠCHT, Praha

## 3.2 Příprava slepičích protilátek

Slepičí protilátky byly izolovány z vaječných žloutků. Pro izolaci specifických frakcí proti PA-IIL byla využita afinitní chromatografie. Označení dílčích frakcí protilátek odpovídá následujícímu způsobu kódování:

- první číslo označuje slepici, z jejíž vaječné byla frakce izolovaná
- písmeno uprostřed označuje typ frakce
  - K ... frakce získaná před imunizací
  - S ... frakce získaná po imunizaci
  - A ... afinitně purifikovaná frakce
  - N ... frakce nezachycená na afinitní koloně
- poslední číslice odpovídá číslu dílčí frakce získané od dané slepice (příklad: 2K1 ... frakce č. 1 získaná z vajec slepice č. 2 před její imunizací).

### 3.2.1 Izolace protilátek z vaječných žloutků

Slepičí protilátky (IgY) byly izolovány z vaječných žloutků slepice před imunizací (kontrolní frakce) a po imunizaci antigenem (specifické frakce). Jako antigen byl v této práci použit rekombinantně připravený PA-IIL  $\Delta$ G/fuc. Jedná se o povrchový lektin PA s mutací snižující afinitu pro fukosu.

#### Použité roztoky:

- PBS s azidem sodným: 0,1 % (w/v) azid sodný ( $\text{NaN}_3$ ); 0,134 M NaCl; 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,2

#### Postup:

Pro izolaci jedné frakce protilátek bylo použito 5-9 vajec. Žloutky byly odděleny od bílků, promyty pod tekoucí vodou a 8x zředěny. Zředění bylo provedeno buď 1:1 s PBS a následně ještě 1:3 s deionizovanou vodou, nebo rovnou 1:7 s kohoutkovou vodou. Následně bylo upraveno pH roztoku na 5,0 přidáním 0,5M HCl za stálého míchání na magnetické míchačce. Homogenát byl přenesen do kónické nádoby a ponechán zmraznout při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (přes noc). Zmrazený homogenát byl přemístěn do trychtýře s filtračním papírem a ponechán filtrovat za postupného rozmrazení do dalšího dne. K čirému filtrátu bylo přidáno 8,8 % (w/v) NaCl a pH roztoku bylo upraveno na 4,0 pomocí 0,5 M HCl za

stálého míchání na magnetické míchačce. Roztok byl ponechán míchat 30 min při laboratorní teplotě a následně precipitovat po dobu 2 h. Následovala centrifugace (30 min, 3500 RPM, Janetzki K70D). Supernatant byl opatrně odstraněn a peleta byla rozpuštěna v *PBS s azidem sodným*. Frakce byly skladovány při 4 °C.

### 3.2.2 Afinitní chromatografie

Principem metody je zachycení specifických protilátek na kolonu s imobilizovaným antigenem, čímž dojde k účinné selektivní separaci dané protilátky.

Jako sorbent byla použita aktivovaná CNBr Sepharosa. Bromkyan reaguje s hydroxylovou skupinou agarosového nosiče za vzniku kyanátového esteru či imidokarbonátu. Tyto skupiny potom dokáží reagovat s primárními aminoskupinami proteinů a vytváří se tak kovalentní vazba ligandu na matici<sup>69</sup>.

V této práci byla použita Sepharosa s navázaným antigenem PA-IIL. Chromatografie probíhala na afinitních sorbentech připravených Bc. P. Pomazalem (1 mg PA-IIL  $\Delta$ G/fuc na 1,75 g CNBr aktivované Sepharosy) a Mgr. M. Růžičkou (10 mg PA-IIL na 1,5 g CNBr aktivované Sepharosy), které byly pro tuto práci spojeny.

#### Použité roztoky:

- *promývací roztok I* (PBS): 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2
- *promývací roztok II* (PBS + 1M NaCl): 1 M NaCl; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2
- *eluční roztok*: 0,05 M diethylamin; případně s přidavkem 2% L-fukosy; pH 11,5
- *regenerační roztok*: 4 M guanidin/HCl; pH 7,2
- *neutralizační pufr*: 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; titrováno 2 M KOH; pH 6,75
- *dialyzační pufr* (PBS s azidem sodným): 0,1 % (w/v) azid sodný (NaN<sub>3</sub>); 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2

#### Postup:

Roztok izolované specifické protilátky proti rekombinantnímu PA-IIL byl smísen s nosičem v poměru 3:1. Pro zablokování vazných míst lektinu byla ke směsi přidána L-fukosa (2 % w/v). Směs byla inkubována přes noc při 4 °C na rotační třepačce.



Směs byla přenesena na kolonu a eluát byl jímán a uchován pod označením „nezachycená frakce“. Kolona byla promývána *promývacím roztokem I* do poklesu absorbance eluátu měřené při vlnové délce 280 nm na hodnotu cca 0,01. Tento postup byl zopakován s *promývacím roztokem II*. Poté byla zahájena eluce zachycené specifické protilátky pomocí *elučního roztoku*. Eluát byl jímán do 2ml mikrozku mávek s neutralizačním pu frem (poměr *elučního roztoku* a *neutralizačního pu ffru* pro dosažení pH 7,2 byl předem určen titrací). U těchto frakcí bylo měřeno spektrum v rozmezí 200-700 nm a frakce s nejvyšším obsahem proteinu (do 1/10 maximální hodnoty  $A_{280}$ ) byly spojeny a dialyzovány proti 10 l *dialyzačního pu ffru* přes noc při 4 °C.

Frakce afinitně purifikovaných protilátek byly uchovány při teplotě 4 °C. Jejich reaktivita vůči lektinu PA-IIL byla ověřena metodou ELISA (kapitola 3.2.4).

Kolona byla regenerována *regeneračním roztokem* do poklesu  $A_{280}$  pod hodnotu 0,01. Následovalo promytí kolony *dialyzačním pu frem*. Kolona s nosičem byla uchována při 4 °C pro další použití.

### 3.2.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu

Koncentrace protilátek byla stanovena spektrofotometricky měřením absorbance při 280 nm ( $A_{280}$ ). Roztok protilátky byl zředěn v roztoku PBS s azidem sodným a následně byla změřena  $A_{280}$ . Při výskytu zákalu byl roztok protilátky centrifugován (5 min, 10 000 RPM, Eppendorf 5415R). Koncentrace protilátky byla vypočtena ze vztahu:

$$\text{koncentrace [mg/ml]} = A_{280} \cdot \text{ředění} \cdot 1,094^*.$$

\*experimentálně stanovený parametr

### 3.2.4 ELISA

ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) je imunochemická metoda, která byla použita pro ověření schopnosti a míry specifické interakce izolovaných slepičích protilátek s antigenem PA-IIL. Antigen byl imobilizován v jamce mikrotitrační destičky, jako primární protilátka byla použita izolovaná frakce slepičí protilátky a jako sekundární protilátka sloužila protilátka proti IgY konjugovaná s alkalickou fosfátasou. Jako substrát pro chromogenní reakci sloužil *p*-nitrofenolfosfát.

#### Použité roztoky:

- PBS: 0,134 M NaCl; 1,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,2

- *imobilizační pufr*: 13 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; pH 9,6
- *PBS + Tween*: 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,134 M NaCl; 0,1% (v/v) TWEEN 20®; pH 7,2
- *blokovací roztok*: 2% (w/v) řádký bílek v *PBS + Tween*
- *vyvolávací roztok*: 30 mM NaHCO<sub>3</sub>; 20 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1% *p*-nitrofenolfosfát
- *zastavovací roztok*: 3 M NaOH

### Postup:

Roztok antigenu PA-IIL v *imobilizačním pufru* o koncentraci 4 µg/ml byl nanesen do mikrotitrační destičky PolySorp v objemu 100 µl/jamka a ponechán inkubovat při 4 °C přes noc. Jamky byly následně promyty 3x 200 µl/jamka *PBS + Tween*. *Blokovací roztok* byl nanesen v objemu 150 µl/jamka a inkubace probíhala 1 h při 37 °C. Následovalo promytí 3x 200 µl/jamka *PBS + Tween*.

Frakce primárních protilátek ředěné v *PBS* byly nanесeny v objemu 100 µl/jamka a ponechány inkubovat 2 h při 37 °C. Byly použity následující koncentrace protilátek:

1. při testování izolovaných kontrolních a specifických frakcí: 90; 30; 10; 3,3 µg/ml
2. při testování afinitně purifikovaných frakcí
  - a) afinitně purifikované frakce: 3; 1; 0,3; 0,1 µg/ml
  - b) nezachycené frakce: 810; 270; 90; 30 µg/ml
  - c) kontrolní frakce: 810; 270; 90; 30; 10; 3,3; 1; 0,3 µg/ml
  - d) specifická protilátka: 90; 30; 10; 3,3 µg/ml.

Následně byly jamky promyty 3x 200 µl *PBS + Tween*. Sekundární protilátka byla zředěna 1:1600 v *PBS* a nanášena v objemu 100 µl/jamka. Inkubace probíhala 1 h při 37 °C. Následovalo promytí 3x 200 µl/jamka *PBS + Tween*. Do jamek bylo nanесeno 100 µl *vyvolávacího roztoku* a po 10 min byla reakce zastavena přidavkem 50 µl *zastavovacího roztoku*.

Intenzita zabarvení byla měřena při vlnové délce 405 nm na přístroji Tecan Sunrise Remote.

### 3.3 Tkáňové kultury

Pro studium bakteriální adheze byly použity *ex vivo* buněčné modely reprezentované liniemi CuFi-1 (ATCC® CRL-4013™) a NuLi-1 (ATCC® CRL-4011™). V obou případech se jedná o imortalizované bronchiální buňky plicního epitelu, přičemž CuFi-1 jsou buňky nesoucí mutaci v *CFTR* genu ( $\Delta F508$ , homozygotní forma) a NuLi-1 jsou buňky izolované od zdravého dárce. Obě linie jsou adherentní.

Práce s tkáňovými kulturami probíhala ve speciální laboratoři s dodržáním aseptických podmínek. Jako podklady pro manipulaci s buněčnými liniemi sloužily produktové listy<sup>70,71</sup>.

#### 3.3.1 Rozmrazení buněčných kultur

Buněčné linie se dlouhodobě skladují v kapalném dusíku, pro krátkodobé uchování lze využít i hlubokomrazicí box s teplotou  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pro kryoprezervaci se využívá dimethylsulfoxid (DMSO), který je však pro buňky při dlouhodobější expozici toxický, proto musí rozmrazení probíhat co nejrychleji.

#### **Postup:**

Vialky se zamraženou buněčnou suspenzí byly ihned po vyjmutí z mrazicího boxu vloženy do vodní lázně vytemperované na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a rychle rozmrazeny (cca 2 min). Obsah vialky byl přenesen do sterilní centrifugační zkumavky obsahující 9 ml vytemperovaného média a buněčná suspenze byla centrifugována (5 min, 1000 RPM, Hettich Universal 320R). Peleta byla resuspendována v 1 ml čerstvého média, následně byl odebrán alikvot na stanovení počtu buněk a jejich viability s využitím trypanové modře (kapitola 3.2.5). Zbýlá buněčná suspenze byla převedena do kultivační lahve ( $25\text{ cm}^2$ ) s povrchem potaženým kolagenem typu IV (kapitola 3.3.3) naplněné 5 ml vytemperovaného média. (Pozn. po rozmrazení se používá inokulum o vyšší buněčné hustotě než při běžné subkultivaci.)

#### 3.3.2 Kultivace buněčných linií

Kultivace buněčných linií probíhala při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 5%  $\text{CO}_2$  (inkubátor MCO-170AIC). Povrch kultivačních lahví byl potažen kolagenem typu IV z lidské placenty, který vytváří vhodné podmínky pro růst těchto kultur. Byly používány dva druhy kultivačních médií,

BEGM a LHC-9. Do médií byla při běžné kultivaci přidávána kombinace antibiotik penicilin-streptomycin (100x koncentrovaný roztok: 6 mg/ml penicilin G sodná sůl, 10 mg/ml streptomycin sulfát). Objem média použitý pro různé velikosti kultivačních lahví byl následující: 15 ml média/75 cm<sup>2</sup> lahev; 5 ml média/25 cm<sup>2</sup> lahev.

### 3.3.3 Příprava kultivačního povrchu

Kultivační povrch lahví byl ošetřen kolagenem typu IV z lidské placenty. Zásobní roztok o koncentraci 0,9 mg/ml byl připraven rozpuštěním lyofilizátu v 0,25 % kyselině octové. Rozpuštění probíhalo při 4 °C cca 4 h za občasného míchání. Tento roztok byl dále 15x zředěn deionizovanou vodou na koncentraci 60 µg/ml a sterilizován přes 0,22 µm filtr. Do kultivačních lahví byl nanášen objem odpovídající pokrytí celého kultivačního povrchu, tzn. 4-5 ml do 75 cm<sup>2</sup> lahve a 2 ml do 25 cm<sup>2</sup> lahve. Inkubace probíhala minimálně 18 h při laboratorní teplotě. Následně byl roztok kolagenu odstraněn a povrch byl 2-3x promyt ekvivalentním množstvím PBS. Kultivační lahve byly ponechány vyschnout dnem vzhůru s pootevřeným uzávěrem v zapnutém laminárním boxu. Nakonec byl uzávěr zajištěn pomocí parafilmu.

Kultivační lahve byly skladovány při 4 °C a před použitím byl povrch znovu promyt PBS.

### 3.3.4 Subkultivace buněčných linií

Subkultivace byla prováděna při dosažení cca 90% pokrytí kultivačního povrchu narostlými buňkami. Pro převedení adherentních buněk do suspenze se používá trypsin-EDTA, jehož působení je následně inhibováno FBS (fetální bovinní sérum). Výměna média byla prováděna každé 2-3 dny.

#### **Postup:**

Po odstranění kultivačního média byl k buňkám přidán roztok trypsin-EDTA (0,25% trypsin/0,53 mM EDTA): 2,5 ml/75 cm<sup>2</sup> lahev a 1,5 ml/25 cm<sup>2</sup> lahev. Inkubace probíhala 8 min při 37 °C a uvolnění buněk z kultivačního povrchu bylo zkontrolováno pomocí mikroskopu. Aktivita trypsinu byla inhibována přidáním ekvivalentního množství 1% FBS v PBS a kultivační povrch byl několikrát jemně opláchnut uvolněnou buněčnou suspenzí pomocí pipety. Suspenze byla převedena do centrifugační zkumavky

a centrifugována (5 min, 1000 RPM, Hettich Universal 320R). Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v 1 ml čerstvého kultivačního média. Byl odebrán alikvot na stanovení počtu a viability buněk. Do nových kultivačních lahví potažených kolagenem IV s příslušným objemem vytemperovaného média bylo nasazeno  $1,5-2,0 \times 10^4$  viabilních buněk/cm<sup>2</sup> (NuLi-1) a  $1-3 \times 10^3$  viabilních buněk/cm<sup>2</sup> (CuFi-1).

### 3.3.5 Stanovení počtu a viability buněk

Ke stanovení počtu a viability buněk se využívá barvivo trypanová modř, které umožňuje rozpoznat živé buňky od mrtvých. Toto barvivo do živé buňky nevstupuje a buňky zůstávají neobarvené na rozdíl od mrtvých buněk, v nichž se barvivo hromadí. Poměr trypanové modře a buněčné suspenze je 1:1. Stanovení se provádí mikroskopicky s využitím hemocytometru (též Bürkerova komůrka).

#### Postup:

Alikvot buněčné suspenze byl vhodně zředěn (médiem či PBS) a smíchán s ekvivalentním objemem 0,4% (w/v) roztoku trypanové modře. Na mřížku Bürkerovy komůrky bylo nanášeno 10 µl směsi a vzorek byl vyhodnocen mikroskopicky. Mřížka se skládá z 9 velkých čtverců, při stanovení bylo vybráno 3-5 z nich pro statistické vyhodnocení.

Počet buněk na 1 ml suspenze se vypočítá ze vztahu:

$$\frac{\text{počet buněk}}{\text{ml}} = \frac{\text{celkový spočítaný počet buněk}}{\text{počet počítaných čtverců}} \cdot \text{ředění vzorku} \cdot 10\,000.$$

### 3.3.6 Zamrazení buněčných kultur

Pro převedení buněk do suspenze byl použit postup jako při běžné subkultivaci (kapitola 3.3.4.). Ze zásobní suspenze byl odebrán alikvot pro stanovení počtu a viability buněk (kapitola 3.3.5.). Bylo připraveno potřebné množství kryoprotekčního média: 60 % (v/v) BEGM nebo LHC-9 médium, 10 % (v/v) DMSO a 30 % (v/v) FBS. Buněčná suspenze byla centrifugována (5-10 min, 1000 RPM, Hettich Universal 320R) a peleta byla resuspendována v kryoprotekčním médiu (doporučená koncentrace  $1-5 \times 10^6$  viabilních buněk/ml). Suspenze o objemu 1-1,5 ml byla převedena do předem vychlazených kryovialek, které byly umístěny do vychlazeného zmrazovacího kontejneru naplněného isopropanolem, který zajišťuje postupné zmrazování vzorků rychlostí cca -1 °C/min.

Kontejner s vialkami byl přemístěn do -80 °C minimálně na 24 h. Následně byly vialky vyjmuty z kontejneru a skladovány při -80 °C (krátkodobé uchování) či v kapalném dusíku (dlouhodobé uchování).

Pozn. při skladování buněčných kultur při teplotě -80 °C po dobu delší než 2 týdny může klesat viabilita buněk.

### 3.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pro studium bakteriální adheze byl použit sbírkový (kontrolní) kmen bakterií PA označený jako PAK (ST 1763). Bakteriální kultura byla uchovávána při teplotě -80 °C. Manipulace probíhala v mikrobiologické laboratoři s dodržáním aseptických podmínek.

#### 3.4.1 Kultivace PAK

Zmrazená bakteriální suspenze byla rozmrazena při laboratorní teplotě. Inokulum bylo zaočkováno do média v množství 10 µl bakteriální suspenze/5 ml média. Pro kultivaci bylo běžně používáno speciální médium pro PA označené jako „PS“ médium. Pro některé optimalizační experimenty bylo též použito LB (Luria-Bertani) médium či minerální „M9“ médium. Složení médií byla následující:

- *PS médium*: 1,6% (w/v) pepton; 1% (w/v) enzymatický kaseinový hydrolyzát; 0,5 % (v/v) glycerol; 57 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 15 mM MgCl<sub>2</sub> (připraveno Ing. H. Bartoňovou, UŽFG, AV ČR)
- *M9 médium*: 16,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5 mM NaCl; 49 mM NH<sub>4</sub>Cl; (sterilizováno v autoklávu); 2 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,2% (w/v) glukosa; (sterilizováno přes 0,22 µm mikrobiální filtr)
- *LB médium*: 1% (w/v) trypton; 0,5% (w/v) kvasinkový extrakt; 171 mM NaCl.

Bakterie byly kultivovány přes noc při 37 °C za konstantního třepání v Erlenmeyerových baňkách (150 RPM, Infors HT Multitron Pro) nebo v 50ml centrifugačních zkumavkách (150 RPM, ES-60 MIUlab). Vždy bylo zaplněno 10 % objemu kultivační nádoby.

#### 3.4.2 Zamrazení PAK

Z bakteriální kultury získané 14h kultivací (kapitola 3.4.1) byly vytvořeny alikvoty o objemu 100 µl. K bakteriální kultuře bylo přidáno ekvivalentní množství (100 µl)

kryoprotektivního média: 40% (w/v) glycerol v PBS (sterilizace přes 0,22 µm filtr). Alikvoty byly zmrazeny v tekutém dusíku a následně skladovány při teplotě -80 °C.

### 3.4.3 Kvantifikace bakterií ve vzorku

Bakterie byly kvantifikovány fotometricky na základě měření zákalu (optické denzity) bakteriální suspenze při vlnové délce 600 nm ( $OD_{600}$ ). Pro výpočet koncentrace bakteriálních buněk v suspenzi byl použit převodní vztah:  $OD_{600} = 1$  odpovídá  $6 \cdot 10^8$  bakterií/ml<sup>72</sup>.

### 3.4.4 Stanovení růstové křivky a exprese PA-III

Do Erlenmeyerovy baňky s 50 ml média (LB či PS) bylo zaočkováno 100 µl rozmrazené kultury PAK. Kultivace probíhala za konstantního třepání při 37 °C (150 RPM, Infors HT Multitron Pro). Po dobu 20 h (LB médium) a 24 h (PS médium) byla každou hodinu odečtena hodnota  $OD_{600}$  a růstová křivka byla vyhodnocena jako závislost  $\log(OD_{600})$  na čase.

V určitých časových intervalech byl též odebrán vzorek kultury pro následné stanovení exprese PA-III v čase (tabulka 2). Přítomnost PA-III byla ověřena metodou Western blot s následnou imunodetekcí slepičími protilátkami (kapitola 3.7).

**Tabulka 2 – Množství kultury odebrané v příslušných časech pro stanovení exprese PA-III.**

Doba kultivace [h]	5	7	9	11	12	13	14	15	16	17	18	20	24
Odebraný objem [ml]	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

## 3.5 Fluorescenční značení buněk s využitím barviv PKH

Pro značení bakteriálních a plicních epitelálních buněk byla použita fluorescenční barviva PKH, která se inkorporují do membrány pomocí svých alifatických řetězců. Barviva jsou rozpustná v Diluentu C (součást balení).

V této práci byly použity dva druhy těchto barviv, PKH26 a PKH67, které se liší svými excitačními a emisními maximy. Pro značení bakteriálních buněk byla použita sloučenina PKH26, která fluoreskuje v žluto-oranžové části spektra a má excitační maximum při 551 nm a emisní maximum při 567 nm. Plicní epitelální buňky byly značení

sloučeninou PKH67, který fluoreskuje v zelené části spektra a má excitační maximum při 490 nm a emisní maximum při 502 nm.

Protokoly vychází z produktových listů<sup>73,74</sup> a diplomové práce Mgr. Libuše Noskové<sup>75</sup>.

### 3.5.1 Fluorescenční značení bakteriálního kmene PAK barvivem PKH26

Pro barvení byla používána kultura PAK kultivovaná 14 h v PS médiu při 37 °C (kapitola 3.4.1). Bakteriální kultura byla centrifugována (5 min, 12000 RPM, Eppendorf 5415R) a peleta byla resuspendována v 1 ml PBS. Následně byla stanovena koncentrace bakterií ve vzorku (kapitola 3.4.3.1). Pro fluorescenční značení bylo odebráno potřebné množství bakterií, které bylo centrifugováno 5 min při 12000 RPM (Eppendorf 5415R). Po pečlivém odebrání supernatantu byla peleta resuspendována v Diluentu C. K suspenzi byl ihned přidán čerstvě připravený roztok 16 µM PKH26 v Diluentu C. Byly použity dva způsoby značení:

a)  $3 \cdot 10^9$  bakterií bylo resuspendováno ve 125 µl Diluentu C a smíseno se 2 µl PKH26 ve 123 µl Diluentu C

b)  $1,5 \cdot 10^9$  bakterií bylo resuspendováno ve 125 µl Diluentu C a smíseno se 2 µl PKH26 ve 123 µl Diluentu C.

Reakční směs byla důkladně promíchána pipetou a ponechána inkubovat 30 min při laboratorní teplotě bez přístupu světla s pravidelným mícháním. Barvení bylo zastaveno přidáním ekvivalentního objemu 1% (w/v) BSA (bovinní sérový albumin) v PBS. Po krátké inkubaci (cca 1 min) byla směs centrifugována (10 min, 13000 RPM, Eppendorf 5415R) a peleta byla následně 3x centrifugačně promyta 0,6 ml PBS (10 min při 13000 RPM a následně 7,5 min a 5 min při 12000 RPM, Eppendorf 5415R). Výsledná bakteriální suspenze byla připravena resuspendováním pelety v 1-2 ml PBS.

Intenzita fluorescence byla měřena na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro. Parametry měření byly následující: Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4 (24-jamková destička) či vyplněný čtverec 3x3 (96-jamková destička), parametr „gain“ byl nastaven na 160 (tzn. napětí 784 V). Výsledek fluorescenčního značení byl hodnocen též mikroskopicky: Nikon Eclipse, filtr 31002 RdiI C87702.



### 3.5.2 Fluorescenční značení buněčných linií barvivem PKH67

Barvivo PKH67 je určeno pro značení buněk převedených do suspenze (kapitola 3.3.4). Z buněčné suspenze bylo odebráno potřebné množství buněk na barvení. Následovalo centrifugační promytí 4 ml PBS (5 min, 1000 RPM, Hettich Universal 320R). Supernatant byl pečlivě odebrán a buněčná peleta obsahující  $4,8 \cdot 10^6$  buněk byla resuspendována ve 250  $\mu$ l Diluentu C. K buněčné suspenzi byl přidán ekvivalentní objem čerstvě připraveného 8  $\mu$ M roztoku PKH67 v Diluentu C (2  $\mu$ l PKH67 v 248  $\mu$ l Diluentu C). Následovalo důkladné promíchání pipetou a inkubace 5 min při laboratorní teplotě bez přístupu světla s pravidelným mícháním.

Pro zastavení reakce byl použit ekvivalentní objem 1% FBS v PBS. Směs byla promíchána a po krátké inkubaci (cca 1 min) byla centrifugována (10 min, 1000 RPM, Hettich Universal 320R). Peleta byla 3x centrifugačně promyta 2 ml BEGM či LHC-9 média (5 min, 1000 RPM, Hettich Universal 320R). Buněčná peleta byla resuspendována v 1-2 ml média. Z této suspenze byl odebrán alikvot pro stanovení počtu a viability buněk (kapitola 3.3.5).

Pro měření relativní fluorescence byl použit spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro, parametry měření byly následující: Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4 (24-jamková destička) či vyplněný čtverec 3x3 (96-jamková destička), parametr „gain“ nastaven automaticky a vyhovující hodnota byla následně použita pro obě linie. Dále byla fluorescence buněk sledována na mikroskopu Nikon Eclipse, filtr 31001 FITC C87701.

## 3.6 Adhezní test

Vliv anti-PA-IIL slepičích protilátek a multivalentních inhibitorů na bázi sacharidů na schopnost adheze bakterií PAK k povrchu plicních epiteliálních buněk CuFi-1 a NuLi-1 byl studován na buněčném modelu pomocí tzv. adhezního testu. Metodika byla převzata z předchozích prací<sup>75,76</sup> a upravena. Buňky i bakterie byly fluorescenčně označeny barvivem PKH (kapitola 3.5).

Byl studován vliv čtyř skupin protilátek:

- a) frakce před imunizací: 1K1, 2K1
- b) frakce po imunizaci: 1S10, 3S1
- c) afinitně purifikované frakce: 1A4a, 2A1, 2A2

d) frakce nezachycené na afinitní koloně: 1N4, 2x přečištěná 1N4, 2N1, 2N2.

Dále byl studován vliv antiadhezivních multivalentních inhibitorů na bázi fukosy označených CSM-539, XIIIc a XIVc (tabulka 3), které poskytla Mgr. Lenka Malinovská, Ph.D. (Národní centrum pro výzkum biomolekul, PřF MU, Brno a výzkumná skupina prof. RNDr. M. Wimmerové, Ph.D, CEITEC, Brno). Vzhledem k ochraně duševního vlastnictví nebylo možné zveřejnit struktury těchto sloučenin.

**Tabulka 3 – Charakteristiky použitých multivalentních inhibitorů.**

Označení inhibitoru	Relativní molekulová hmotnost	Valence*
CSM-539	2074,16	tetravalentní
XIIIc	4861,48	dodekavalentní
XIVc	4637,05	dodekavalentní

\*stupeň valence odpovídá počtu terminálních fukosových zbytků

Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez protilátek či inhibitorů). Jednotlivá experimentální uspořádání byla vyhodnocena jako poměr relativní fluorescence bakterií vztažený na relativní fluorescenci buněk.

### **Postup:**

Médium vytemperované na teplotu 37 °C bylo pipetováno do 24-jamkové (96-jamkové) destičky Corning CellBind® v objemu 750 µl/jamka (150 µl/jamka). Do média byl vnesen alikvot fluorescenčně značených buněk CuFi-1 či NuLi-1 (kapitola 3.5.2) tak, aby výsledné množství odpovídalo  $5,5 \cdot 10^5$  buněk/jamka ( $8,4 \cdot 10^4$  buněk/jamka). Buňky byly inkubovány cca 42-45 h (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), aby došlo k vytvoření monovrstvy a regeneraci buněk po barvení.

Jednotlivé frakce slepičích protilátek byly zbaveny azidu sodného dialýzou proti 5 l PBS. Dialýza probíhala přes noc při 4 °C za mírného míchání na magnetické míchače a pufr byl v průběhu 1x vyměněn. Následně byla stanovena koncentrace protilátek po dialýze (kapitola 3.2.3.). Pro adhezní testy byla použita koncentrace protilátky v jamce rovna 1 mg/ml.

Bakteriální kultura PAK byla kultivována v PS médiu 14 h za konstantního třepání (kapitola 3.4.1). Následovalo fluorescenční značení (kapitola 3.5.1) a kvantifikace bakterií (kapitola 3.4.3). Množství bakterií v jamce bylo oproti buňkám stonásobné, tedy  $5,5 \cdot 10^7$  bakterií/jamka ( $8,4 \cdot 10^6$  bakterií/jamka).

Pro jednotlivá experimentální uspořádání byly připraveny zásobní suspenze:

1. neošetřené buňky:  $5,5 \cdot 10^7$  PAK/jamka ( $8,4 \cdot 10^6$  PAK/jamka); PBS
2. a) buňky ošetřené protilátkou:  $5,5 \cdot 10^7$  PAK/jamka ( $8,4 \cdot 10^6$  PAK/jamka);  
1 mg/ml roztok protilátky; PBS  
nebo b) buňky ošetřené multivalentními inhibitory:  $8,4 \cdot 10^6$  PAK/jamka;  
3 mM – 2  $\mu$ M roztok inhibitoru; PBS.

Buňky CuFi-1 či NuLi-1, které v jamkách destičky vytvořily monovrstvu, byly promyty od média 800  $\mu$ l (200  $\mu$ l) PBS. Do každé jamky bylo nanášeno 300  $\mu$ l (50  $\mu$ l) příslušné bakteriální suspenze ( $\pm$  protilátka či inhibitor), s níž byly buňky ponechány inkubovat 2 h při laboratorní teplotě bez přístupu světla. Nenavázané bakterie byly z jamek odstraněny promytím PBS: 1x 500  $\mu$ l (100  $\mu$ l) a 2x 350  $\mu$ l (60  $\mu$ l). Následovalo převrstvení buněk 100  $\mu$ l (40  $\mu$ l) PBS (ochrana před vyschnutím).

Pro měření relativní fluorescence byl použit spektrofleurimetr Tecan Infinite M200 Pro s programem i-Control. Parametry měření byly nastaveny:

- a) pro PKH67 - Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4 (24-jamková destička) či vyplněný čtverec 3x3 (96-jamková destička), parametr „gain“ nastaven automaticky a vyhovující hodnota byla následně použita pro obě linie
- b) pro PKH26 - Ex/Em: 522/569 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky: vyplněný kruh 4x4 (24-jamková destička) či vyplněný čtverec 3x3 (96-jamková destička), parametr „gain“ 160.

Dále byla jednotlivá experimentální stanovení hodnocena s využitím mikroskopu Nikon Eclipse s programem NIS-Elements AR 2.30.

## 3.7 Elektroforéza a Western blot

### 3.7.1 Příprava vzorků

#### Použité roztoky:

- *lyzační pufr*: 1 mg/ml lysozym; cOmplete™ ULTRA (1 tableta/50 ml pufru)
- *3x koncentrovaný vzorkový pufr*: 0,22 M Tris-HCl (pH 6,8); 35 % (v/v) glycerol; 8,1 % (w/v) SDS; 0,0035 % (w/v) bromfenolová modř
  - skladováno při -20 °C, před použitím přidáno 15 % β-merkaptoethanolu

#### Postup:

Bakteriální kultura PAK byla kultivována, viz výše (kapitola 3.4.1 či 3.4.4). Bylo stanoveno množství bakteriálních buněk v kultuře (kapitola 3.4.3). Kultura byla centrifugována 15 min při 4500 RPM a 4 °C (HERMLE Z 383 K). Peleta byla 1x centrifugačně promyta PBS (15 min, 4500 RPM, 4 °C, HERMLE Z 383 K) a po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována v *lyzačním pufru* v množství odpovídajícím přibližně 1 ml *lyzačního pufru* na 13 ml bakteriální kultury s  $OD_{600} = 1$ . Suspenze byla sonikována na ledu (Bandelin VW 3100, amplituda 50 %, 2 min, 15s pulzy). V některých případech byla část lyzátu odebrána a centrifugována (10 min, 16100 RPM, Eppendorf 5415R). Jako vzorek pro následnou elektroforézu byl použit supernatant či celý lyzát po sonikaci. U některých vzorků bylo nutné stanovit koncentraci proteinu v jednotlivých vzorcích (kapitola 3.7.2) a následně je zředit na stejnou koncentraci, aby bylo na separační gel naneseno uniformní množství proteinu.

Jako standard sloužil rekombinantní PA-IIL. Byl připraven jeho zásobní roztok v PBS o koncentraci 1 mg/ml, který byl následně ředěn a nanášen do jamek gelu v množství 1,7-2,0 µg.

Připravené vzorky byly smíseny v poměru 2:1 s vzorkovým pufrem a povařeny 10 min při 100 °C. Následovala krátká centrifugace na stolní centrifuze (mini centrifuga Spectrafuge™), aby došlo k odstředění zkondenzované vody.

### 3.7.2 Stanovení koncentrace proteinu v bakteriálním lyzátu

Pro stanovení koncentrace proteinu v bakteriálním lyzátu byla použita kyselina bicinchoninová (BCA). V alkalickém prostředí se v přítomnosti proteinu redukuje měďnaté

ionty ( $\text{Cu}^{2+}$ ) na měďné ( $\text{Cu}^+$ ), které s BCA vytváří fialový komplex detekovatelný při vlnové délce 562 nm. Pro stanovení byl použit komerční set Pierce™ Microplate BCA Protein Assay<sup>77</sup>.

#### **Postup:**

Pro stanovení byla použita 96-jamková průhledná mikrotitrační destička s plochým dnem. Do prvních třech jamek byl nanesen slepý vzorek (deionizovaná voda). Následovalo nanesení proteinového standardu (BSA) v duplikátech o koncentracích: 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 a 2,0 mg/ml. Vzorky, tzn. lyzáty PAK, byly nanášeny 5x zředěné v tripletech. Všechny vzorky (slepý vzorek, standard, lyzáty) byly nanášeny v množství 9  $\mu\text{l}$  doprostřed jamky. Následně byly do každé jamky přidány 4  $\mu\text{l}$  „compatibility reagent“ a 260  $\mu\text{l}$  „working“ reagent“. „Working reagent“ byl připraven smícháním roztoků „reagent A“ a „reagent B“ v poměru 50:1. Složení roztoků bylo následující:

- „reagent A“: 2% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 0,95% (w/v)  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,4% (w/v)  $\text{NaOH}$ ; 0,16% (w/v) vínan sodno-draselný; pH 11,25
- „reagent B“: 4% (w/v)  $\text{CuSO}_4$ .

Inkubace probíhala 30 min při 37 °C, následně byla destička ještě ponechána 5 min při laboratorní teplotě. Na spektrofotometru Tecan Sunrise byla měřena absorbance vzorků při 562 nm. Koncentrace vzorků byla vyhodnocena v programu KIM 32.

### **3.7.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu**

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) je elektromigrační metoda používaná pro separaci proteinů v denaturujícím prostředí<sup>78,79</sup>.

V této práci byla tato metoda využita pro separaci proteinů přítomných v bakteriálním lyzátu PAK.

#### **Použité roztoky:**

- 10% (w/v) roztok peroxodisíranu amonného (APS)
- 10% (w/v) roztok dodecylsírany sodného (SDS)
- *puf. A*: 1,5 M Tris-HCl; pH 8,8
- *puf. B*: 1,0 M Tris-HCl, pH 6,8

- *polymerační roztok*: 29% (w/v) akrylamid, 1% (w/v) bisakrylamid
- *elektrodový pufr*: 50 mM Tris-base; 384 mM glycin; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,5
- *barvicí roztok*: 9,2% (v/v) kyselina octová; 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB); 46% (v/v) ethanol
- *odbarvovací roztok*: 10% (v/v) kyselina octová; 25% (v/v) ethanol

Gely:

- *15% separační gel*: 1,4 ml dH<sub>2</sub>O; 1,52 ml *pufu A*; 3 ml *polymeračního roztoku*; 60 µl 10% SDS; 20 µl 10% APS; 2,4 µl TEMED (tetramethylethyldiamin)
- *4% zaostřovací gel*: 1,02 ml dH<sub>2</sub>O; 417 µl *pufu B*; 417 µl *polymeračního roztoku*; 16,7 µl 10% SDS; 8,3 µl 10% APS; 1,7 µl TEMED

### Postup:

Skla byla vyčištěna a odmaštěna ethanolem. Následně byla složena elektroforetická aparatura (Bio-Rad). Roztok pro přípravu *separačního gelu* (15%) byl nalit asi 2 cm pod okraj kratšího skla (cca 5 ml) a převrstven 0,7 ml isopropanolu. Polymerace probíhala 1 h. Po skončení polymerace byl isopropanol odstraněn, gel byl 3x propláchnut deionizovanou vodou. *Zaostřovací gel* byl nalit pod okraj skla a byl do něj zasunut hřeben, polymerace probíhala 45 min. Jamky byly opatrně promyty deionizovanou vodou a osušeny. Skla s gely byla upevněna do držáku s elektrodami a vložena do elektroforetické vany. Mezi skla byl až po okraj nalit *elektrodový pufr*. Do jamek byl nanesen proteinový standard o objemu 5 µl. Následovalo nanesení připravených vzorků (kapitola 3.7.1). Elektroforetická vana byla po rysku zalita *elektrodovým pufrem* a po zapojení ke zdroji byly nastaveny parametry: konstantní napětí 150 V, 60 mA/gel, 90 min. Po skončení byl vylit *elektrodový pufr*. Skla byla oddělena od sebe a od *separačního gelu* byl odstraněn *zaostřovací gel*. Gel byl přenesen do misky s *přenosovým pufrem* a následoval Western blot s následnou imunodetekcí (kapitola 3.7.4).

### 3.7.4 Western blot s následnou imunodetekcí

Metoda přenosu („blotting“) proteinů z elektroforetického gelu na nitrocelulosovou či polyvinylidenfluoridovou (PVDF) membránu se nazývá Western blot<sup>80</sup>.

Po přenosu proteinů na membránu následovala imunodetekce rekombinantního PA-IIL a PA-IIL přítomného v bakteriálním lyzátu PAK pomocí slepičích protilátek. Jako sekundární protilátka byla použita anti-IgY protilátka konjugovaná s alkalickou fosfátasou.

#### **Použité roztoky:**

- *přenosový pufr*: 25 mM Tris-base; 192 mM glycín; 20 % (v/v) methanol
- *10x koncentrovaný TBS pufr*: 20 mM Tris-base; 137 mM NaCl; pH 7,6
- *0,1% TBS-Tween*: *TBS pufr*; 0,1 % Tween 20
- *blokovací roztok*: 5 % (w/v) Blotting-Grade Blocker v *0,1% TBS-Tween*
- *roztok primární protilátky*:
  - afinitně purifikované: 1 µg/ml protilátky; 2 % (w/v) Blotting-Grade Blocker; *0,1% TBS-Tween*
  - ostatní: 30 µg/ml protilátky; 2 % (w/v) Blotting-Grade Blocker; *0,1% TBS-Tween*
- *roztok sekundární protilátky*: 0,01 % (v/v) Anti-Chicken IgY (IgG)-Alkaline Phosphatase; 2 % (w/v) Blotting-Grade Blocker; *0,1% TBS-Tween*
- *vyvolávací pufr*: 100 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 9
- *vyvolávací roztok pro alkalickou fosfátasu*: 1 ml *vyvolávacího pufru*; 6,6 µl NBT (nitro modř tetrazolium); 3,3 µl BCIP (5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát p-toluidinová sůl)

#### **Postup:**

Byla připravena membrána o velikosti 8,4 x 5,3 cm. PVDF membránu je nutné aktivovat smočením v methanolu po dobu 30 s. Následuje její promytí v *přenosovém pufru* 3x 10 min za konstantního třepání (50 RPM, Witeg SHO-2D). NC membránu je nutné před použitím pouze namočit v *přenosovém pufru*.

Na anodu aparátu pro horizontální přenos (Biometra Fastblot B43) byl umístěn „sendvič“ sestávající z následujících vrstev smočených v *přenosovém pufru* v pořadí: 3 ks Whatman filtrační papír, membrána (uválet), elektroforetický gel, 3 ks Whatman filtrační papír (uválet). Aparát byl uzavřen přiklopením katody a na zdroji byly nastaveny parametry přenosu: 170 mA, 25 V, 30 min/2 gely. Gel i membrána byly po přenosu promyty v deionizované vodě. Gel byl vložen do *barvicího roztoku* na cca 1 h za

konstantního třepání (50 RPM, Witeg SHO-2D). Následně byl vložen do *odbarvovacího roztoku*, ve kterém byl za konstantního třepání (50 RPM, Witeg SHO-2D) odbarvován do vymizení pozadí. *Odbarvovací roztok* byl několikrát vyměněn.

Membrána byla vložena do 50ml centrifugační zkumavky, ve které byly provedeny všechny následující kroky až po vyvolání. Pro konstantní omývání membrány byla použita rolovací třepačka (MX-T6-S, Scilogex), objem tekutiny ve zkumavce byl vždy 10 ml.

Membrána byla promyta *TBS pufrem* a inkubována s *blokovacím roztokem* 1 h při laboratorní teplotě. Membrána byla promyta 3x 5 min 0,1% *TBS-Tween*. Inkubace s *roztokem primární protilátky* probíhala přes noc při 4 °C (případně 2 h při laboratorní teplotě). Poté byla membrána promyta 5x 5-10 min 0,1% *TBS-Tween* a 1x 5-10 min *TBS pufrem*. Následovala inkubace s *roztokem sekundární protilátky* 1 h při laboratorní teplotě. Membrána byla promyta 5x 5-10 min 0,1% *TBS-Tween* a 1x 5-10 min *TBS pufrem*.

Vyvolání membrány bylo prováděno ve „vaničce“ vyrobené z parafilmu. Na 1 membránu byly použity 1-2 ml *vyvolávacího roztoku pro alkalickou fosfatasu*, do kterého byla membrána vložena. Reakce byla zastavena přenesením membrány do deionizované vody.



## 4 Výsledky

### 4.1 Izolace protilátek z vaječných žloutků

Slepice č. 1 byla imunizována antigenem PA-IIL  $\Delta$ G/fuc. Frakce izolovaná z vajec slepice před imunizací je označená jako 1K1, frakce získané po aplikaci prvního imunizačního schématu jsou označeny 1S1 a 1S2, frakce 1S3-1S9 jsou získány po podporující imunizační dávce (tabulka 4).

Koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích byla stanovena spektrofotometricky a je uvedena v tabulce 4.

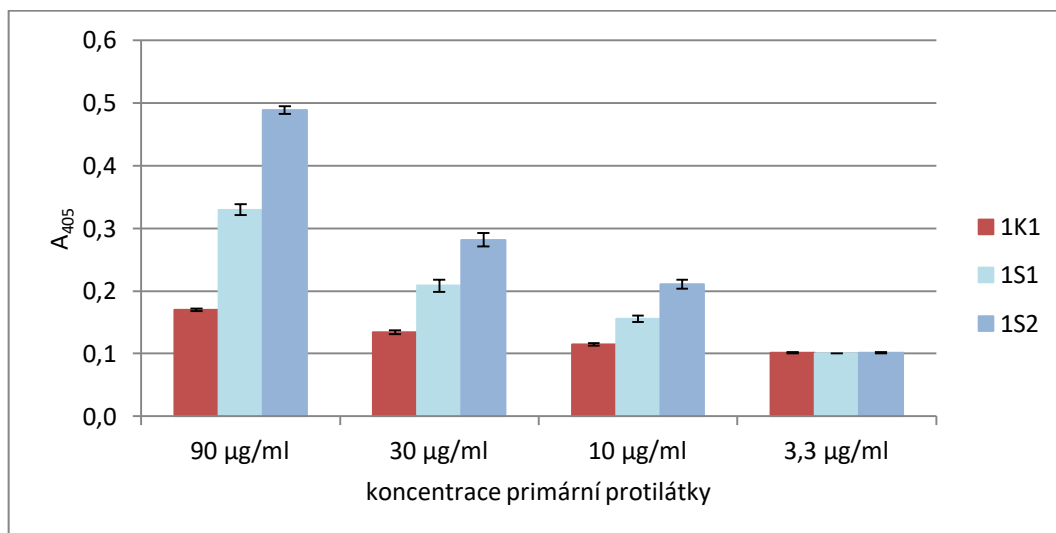
Experiment byl prováděn ve spolupráci s Bc. P. Pomazalem.

**Tabulka 4 - Protilátky připravené proti antigenu PA-IIL  $\Delta$ G/fuc.**

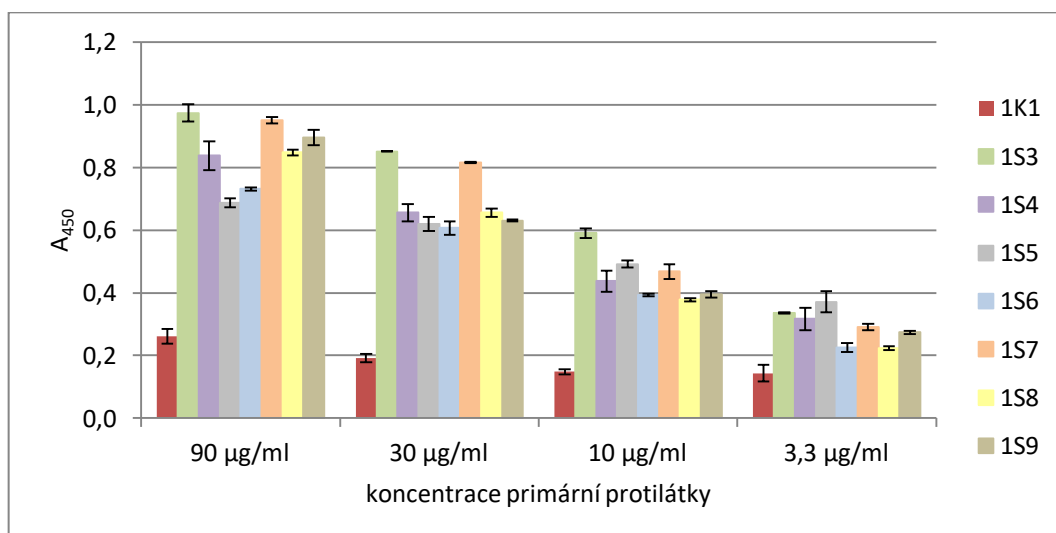
Název frakce	Datum sběru vajec	Počet vajec	Koncentrace proteinu IgY frakce [mg/ml]
1K1	říjen 2016	5	38,2
1S1	12. 11. – 17. 11. 2016	6	43,1
1S2	26. 12. 2016 – 1. 1. 2017	7	36,5
1S3	23. 3. – 10. 4. 2017	9	35,5
1S4	9. 6. – 25. 6. 2017	8	19,8
1S5	27. 6. – 11. 7. 2017	8	26,8
1S6	13. 7. – 19. 8. 2017	8	29,6
1S7	20. 8. – 27. 8. 2017	8	32,6
1S8	27. 8. – 9. 10. 2017	8	35,9
1S9	12. 11. – 15. 12. 2017	8	38,7

#### 4.1.1 Ověření specifity izolovaných protilátek metodou ELISA

Pro ověření schopnosti protilátek získaných po imunizaci PA-IIL  $\Delta G/fuc$  rozpoznat antigen byla použita metoda ELISA. V jamkách byl imobilizován rekombinantní PA-IIL. Míra produkce specifických protilátek u frakcí 1S1-1S9 byla porovnávána s reaktivitou frakce 1K1. Výsledky pro frakce 1S1-1S2 znázorňuje obrázek 9, pro frakce 1S3-1S9 obrázek 10. Protilátky byly nanášeny v koncentracích 90; 30; 10 a 3,3  $\mu g/ml$ .



**Obrázek 9 – Ověření imunoreaktivity frakcí 1S1 a 1S2 metodou ELISA.** Reaktivita protilátek s antigenem PA-IIL je vyjádřena jako závislost absorbance při 405 nm na použitých koncentracích primárních protilátek: frakce získaná před imunizací (1K1), frakce získané po imunizaci (1S1, 1S2).

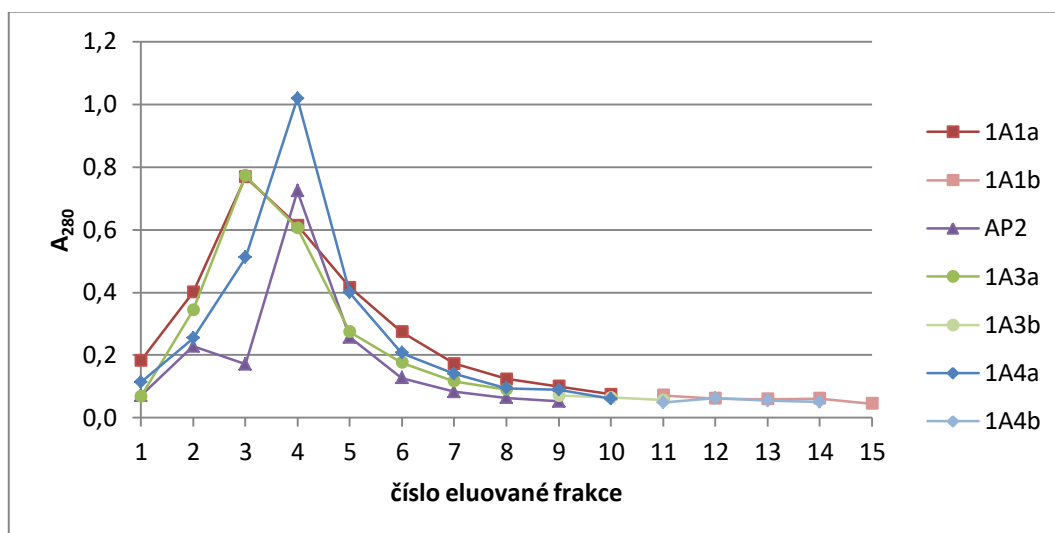


**Obrázek 10 - Ověření imunoreaktivity frakcí 1S3-1S9 metodou ELISA.** Reaktivita protilátek s antigenem PA-IIL je vyjádřena jako závislost absorbance při 405 nm na použitých koncentracích primárních protilátek: frakce získaná před imunizací (1K1), frakce získané po imunizaci (1S3-1S9).

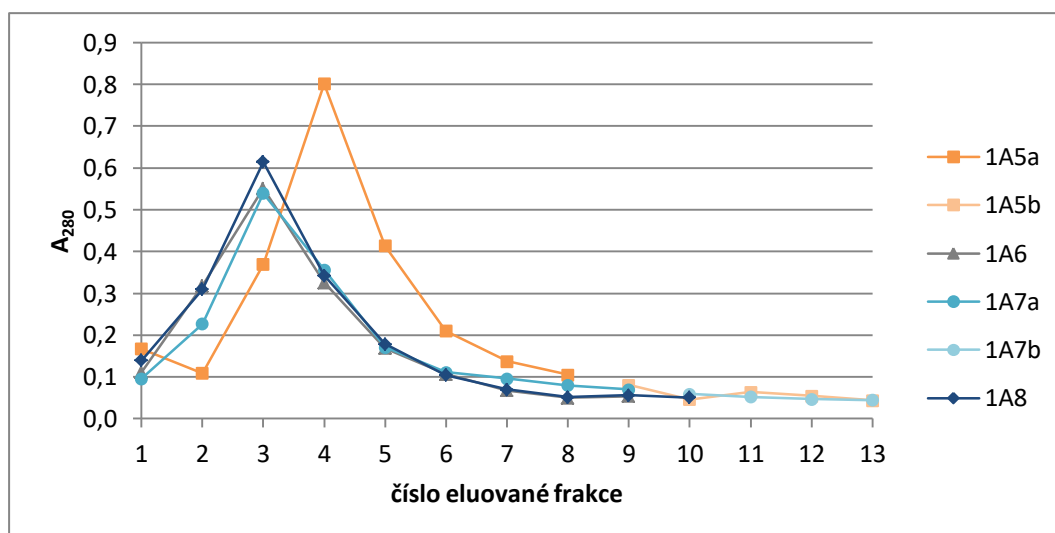
## 4.2 Afinitní chromatografie

Pro izolace specifických protilátek proti PA-IIL byla využita afinitní chromatografie. Byly izolovány frakce označené 1A1-1A8, které vznikly přečištěním frakce 1S10. Tato frakce byla připravena spojením frakcí 1S3-1S8 (kapitola 4.1). Experiment byl prováděn ve spolupráci s Bc. P. Pomazalem.

Frakce 1S10 byla purifikována po částech kvůli omezené kapacitě kolony. Inkubace frakce se sorbentem probíhala v přítomnosti 2% L-fukosy. Nezachycené frakce (1N1-1N8) byly uchovány. Kolona byla promyta a eluát uvolněný diethylaminem byl jímán za současného spektrofotometrického sledování obsahu proteinů v roztoku (obrázek 11 a obrázek 12, str. 44).



**Obrázek 11 - Eluční profil afinitní chromatografie anti-PA-IIL protilátek (1. část).** Postupně byly eluovány frakce 1A1a-1A4b z poimmunizační směsné frakce (1S10), jako eluční roztok byl použit 0,05M diethylamin (pH = 11,5). Absorbance byla měřena při 280 nm.



**Obrázek 12 - Eluční profil afinitní chromatografie anti-PA-III protilátek (2. část).** Postupně byly eluovány frakce 1A5a-1A8 z poimunizační směsné frakce (1S10), jako eluční roztok byl použit 0,05M dietylamín (pH = 11,5). Absorbance byla měřena při 280 nm.

Vždy byly spojeny frakce s nejvyšším obsahem proteinů, tzv. hlavní frakce (1A1a, 1A2a, 1A3a, 1A4a, 1A5a, 1A6, 1A7a, 1A8). Vedlejší frakce jsou označeny příponou „b“. Po dialýze byly znovu změřeny absorbance purifikovaných frakcí, ze kterých byla vypočtena koncentrace. Následně byly změřeny objemy jednotlivých frakcí afinitně purifikovaných protilátek a stanoveny výtěžky (tabulka 5, str. 45).

**Tabulka 5 - Charakteristiky anti-PA-IIL/ PA-IIL ΔG frakcí získaných afinitní chromatografií.**

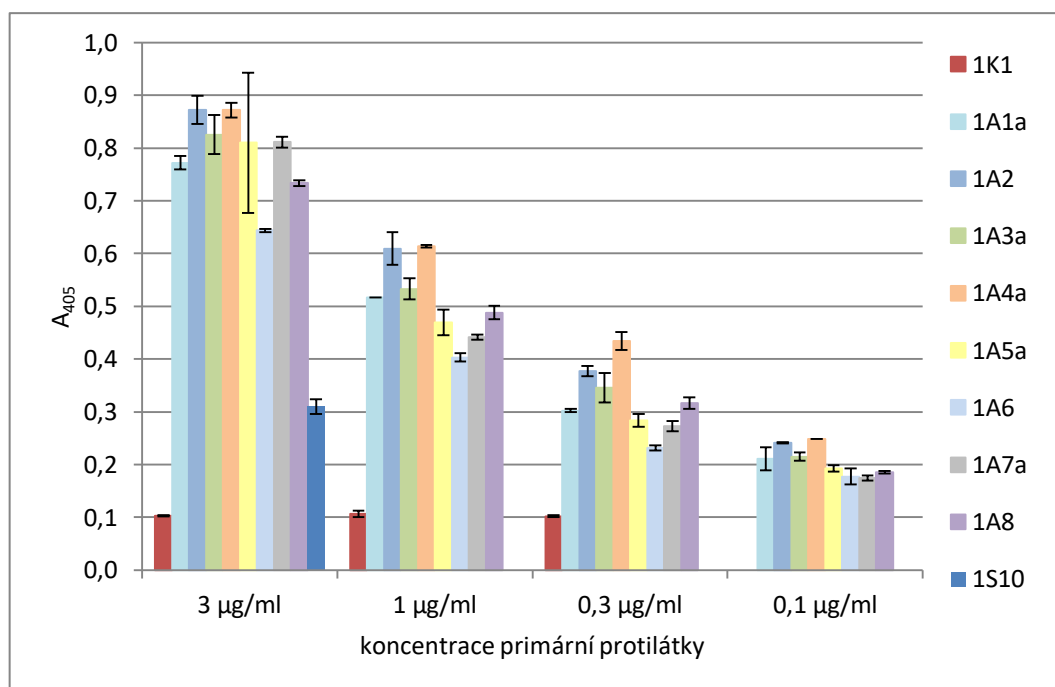
Frakce	Koncentrace [μg/ml]	Objem [ml]	Obsah proteinu [μg]	Výtěžek* [%]
1A1a	211	20,2	4733	0,68%
1A1b	44	10,7		
1A2	232	19,9	4617	0,63%
1A3a	282	19	5709	0,78%
1A3b	54	6,5		
1A4a	281	20,9	6334	0,87%
1A4b	49	9,4		
1A5a	254	19	5278	0,72%
1A5b	40	11,3		
1A6	207	20	4140	0,57%
1A7a	177	19,9	4619	0,63%
1A7b	129	8,5		
1A8	201	21,5	4322	0,68%

\*výtěžek byl vypočten z množství protilátky aplikované na kolonu

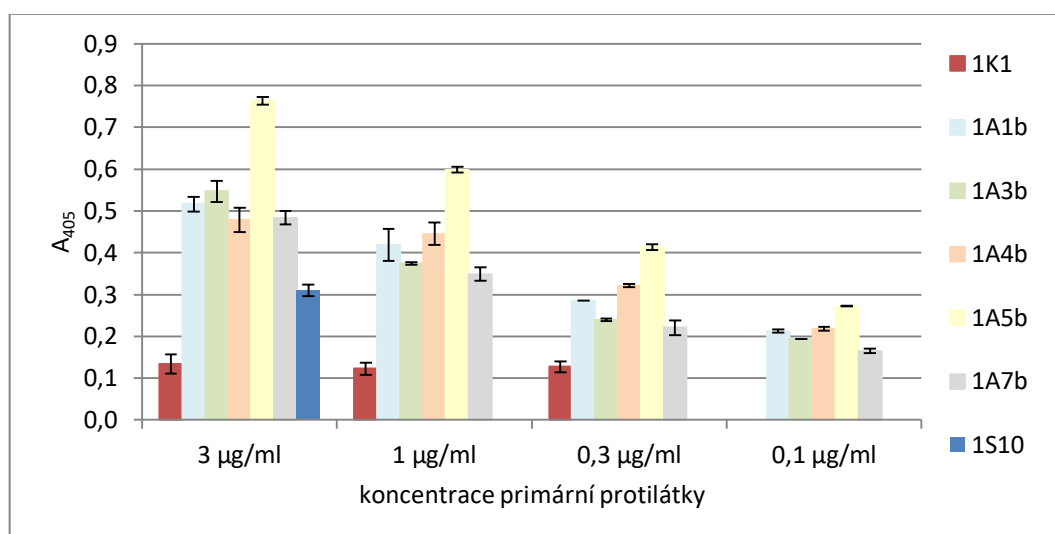
#### 4.2.1 Vyhodnocení afinitní chromatografie metodou ELISA

Pro vyhodnocení afinitní chromatografie protilátek byla použita metoda ELISA. Jako antigen byl použit rekombinantní PA-IIL. Byly testovány frakce (1A1a-1A8) získané afinitní chromatografií frakce 1S10. Dále byly testovány nezachycené frakce (1N11-1N8) a pro srovnání byla použita 1K1.

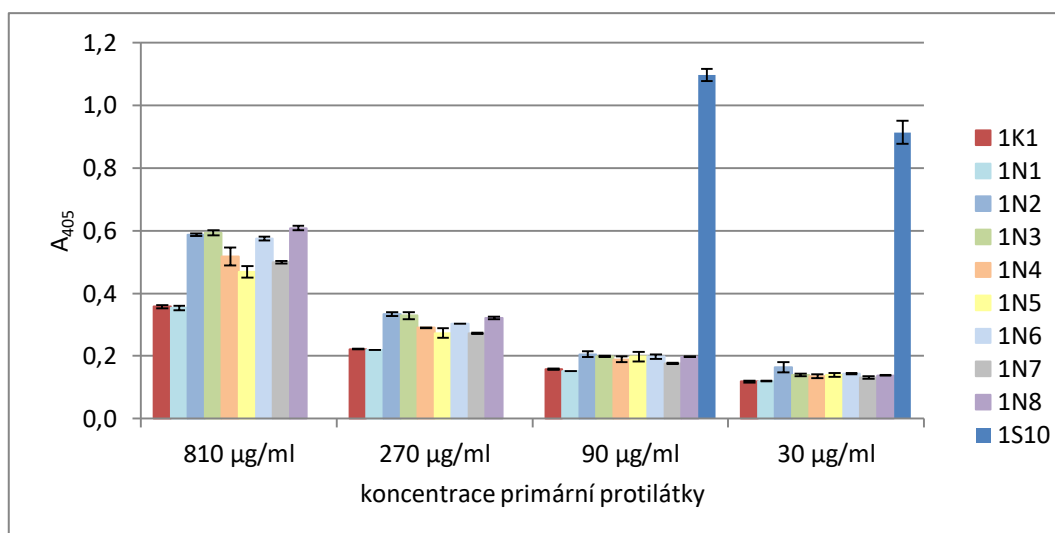
Výsledky znázorňující míru čistoty protilátek jsou znázorněny na obrázku 13 a 14, str. 46. Úspěšnost purifikace zobrazuje obrázek 15, str. 47.



**Obrázek 13 – Vyhodnocení afinitní chromatografie metodou ELISA.** Reaktivita protilátek s antigenem PA-IIL je vyjádřena jako závislost absorbance při 405 nm na použitých koncentracích primárních protilátek: frakce před imunizací (1K1), frakce po imunizaci (1S10) a hlavní afinitně purifikované frakce (1A1a-1A8).



**Obrázek 14 - Vyhodnocení afinitní chromatografie metodou ELISA.** Reaktivita protilátek s antigenem PA-IIL je vyjádřena jako závislost absorbance při 405 nm na použitých koncentracích primárních protilátek: frakce před imunizací (1K1), frakce po imunizaci (1S10) a vedlejší afinitně purifikované frakce (1A1b-1A7b).



**Obrázek 15 – Vyhodnocení afinitní chromatografie metodou ELISA.** Reaktivita protilátek s antigenem PA-IIL je vyjádřena jako závislost absorbance při 405 nm na použitých koncentracích primárních protilátek: frakce před imunizací (1K1), frakce po imunizaci (1S10) a nezachycené frakce (1N1-1N8).

### 4.3 Porovnání reaktivity vybraných frakcí protilátek s různými modifikacemi PA-IIL

Pro porovnání reaktivity vybraných frakcí protilátek s různými modifikacemi PA-IIL byly použity dvě metody: Western blot s následnou imunodetekcí a ELISA.

Byly testovány následující protilátky: frakce získané po imunizaci (1S10, 3S1), frakce nezachycené na afinitní koloně (2x přečištěná 1N4, 2N1) a afinitně purifikované frakce (1A4a, 2A2). Použité koncentrace protilátek byly u obou metod shodné, tedy 1 µg/ml u afinitně purifikovaných a 30 µg/ml u ostatních frakcí.

#### 4.3.1 Western blot s následnou imunodetekcí

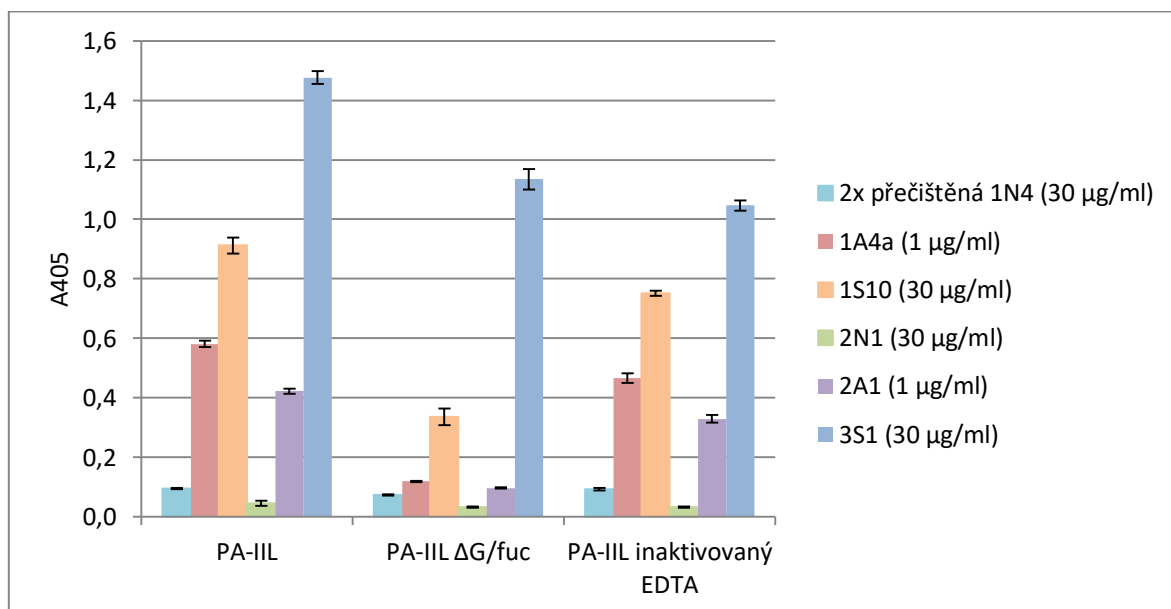
Jako antigeny byly použity rekombinantně připravené lektiny PA-IIL a PA-IIL ΔG/fuc. Proteiny byly z elektroforetického gelu přeneseny na membránu a následovala jejich imunodetekce pomocí vybraných frakcí slepičích protilátek (obrázek 16, str. 48).



**Obrázek 16 – Membrána po imunodetekci lektinů.** Byla porovnána reaktivita vybraných frakcí protilátek s rekombinantními lektiny: (A) PA-IIL, (B) PA-IIL  $\Delta$ G/fuc. Pro detekci byly použity frakce: získané po imunizaci (1S10, 3S1), afinitně purifikované (1A4a, 2A1) a nezachycené na afinitní koloně (1N4, 2N1).

### 4.3.2 ELISA

Jako antigeny byly použity rekombinantní lektiny PA-IIL, PA-IIL  $\Delta$ G/fuc a PA-IIL inaktivovaný EDTA. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 17.



**Obrázek 17 – Porovnání reaktivity vybraných frakcí protilátek metodou ELISA.** Reaktivita protilátek s různými modifikacemi antigenu PA-IIL odpovídá absorbanci při 405 nm. Jako antigeny byly použity rekombinantní lektiny PA-IIL, PA-IIL  $\Delta$ G/fuc a PA-IIL inaktivovaný EDTA. Afinitně purifikované frakce (1A4a, 2A2) byly testovány v koncentraci 1  $\mu$ g/ml. Frakce získané po imunizaci (1S10, 3S1) a frakce nezachycené na afinitní koloně (2x přečištěná 1N4, 2N1) byly testovány v koncentraci 30  $\mu$ g/ml.

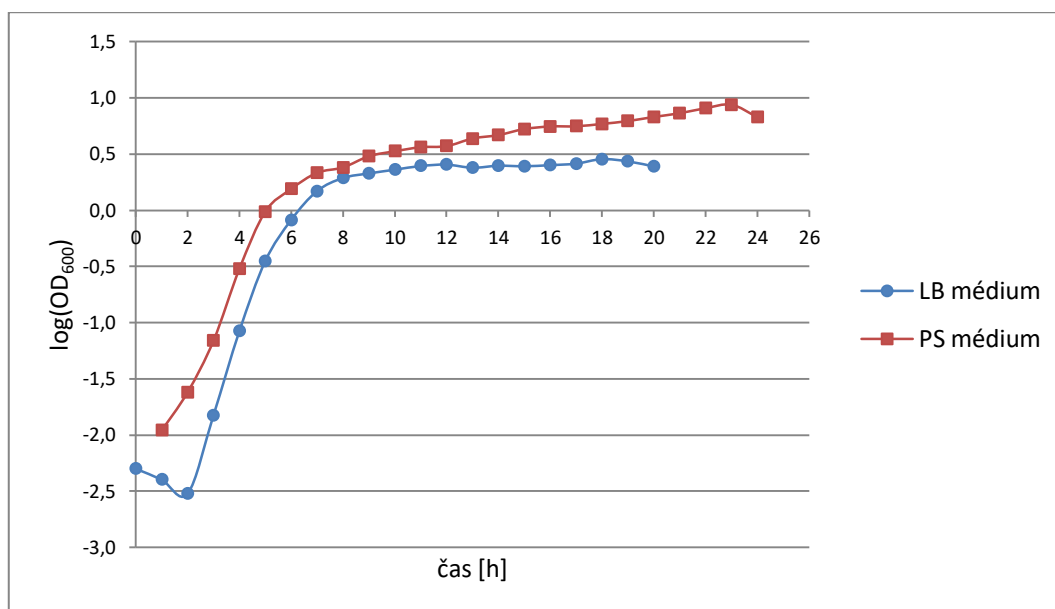
## 4.4 Studium přítomnosti PA-IIL v bakteriální kultuře

Pro studium přítomnosti PA-IIL v různých fázích růstu kultury PAK bylo nutné stanovit růstovou křivku. Pro ověření přítomnosti lektinu v kultuře PAK byla použita metoda Western blot s následnou imunodetekcí.



#### 4.4.1 Růstová křivka

Byl studován růst bakteriální kultury PAK v LB médiu po dobu 20 h a v PS médiu po dobu 24 h. V pravidelných intervalech (1 h) byly odebírány alikvoty kultury a byla měřena hodnota  $OD_{600}$ . Do grafu byla vynesena závislost  $\log(OD_{600})$  na čase (obrázek 18).



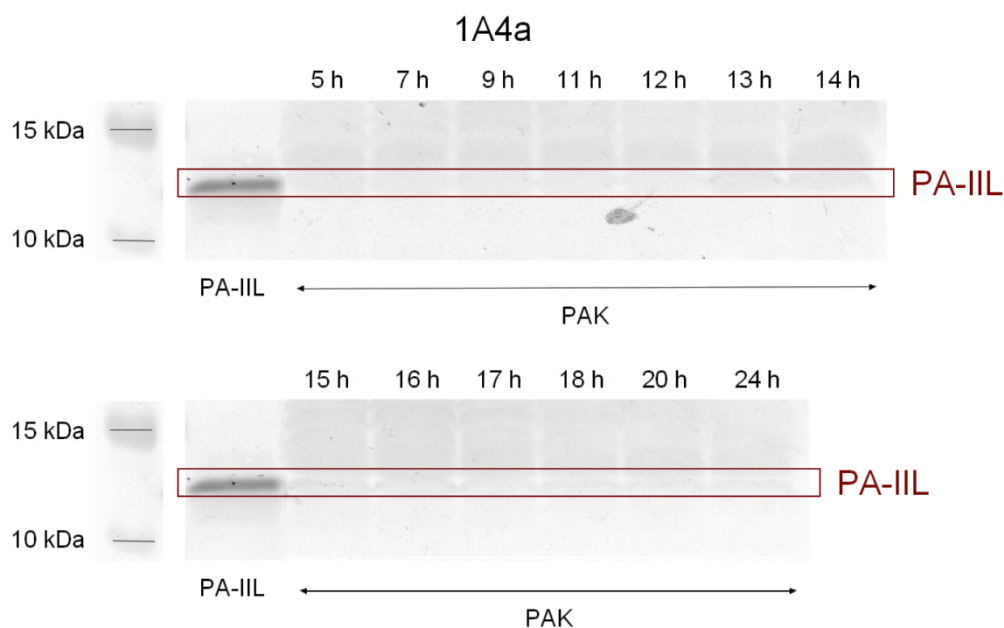
**Obrázek 18 – Růstová křivka PAK.** Byl porovnán růst bakteriální kultury ve dvou médiích: LB a PS. Křivka byla vyhodnocena jako závislost  $\log(OD_{600})$  na čase.

#### 4.4.2 Western blot s následnou imunodetekcí

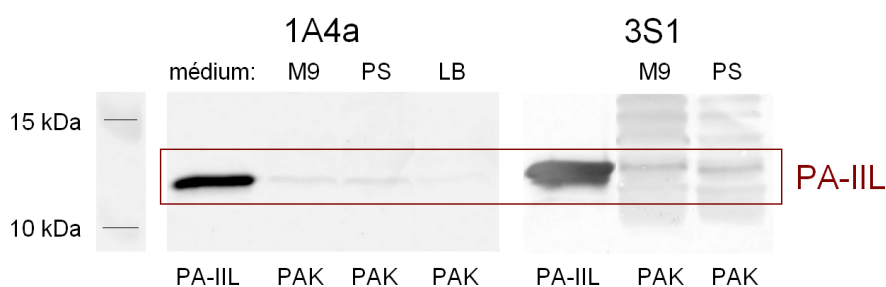
Proteiny přítomné v bakteriálním lyzátu PAK byly rozděleny pomocí SDS-PAGE (kapitola 3.7.3.). Po přenosu proteinů na membránu následovala imunodetekce PA-IIL pomocí vybraných frakcí slepičích protilátek: frakce získaná po imunizaci (3S1) a afinitně purifikovaná frakce (1A4a). Použité koncentrace protilátek byly: 1  $\mu\text{g/ml}$  u afinitně purifikovaných a 30  $\mu\text{g/ml}$  u ostatních frakcí.

Byla testována přítomnost PA-IIL v lyzátu PAK v závislosti na různých podmínkách kultivace:

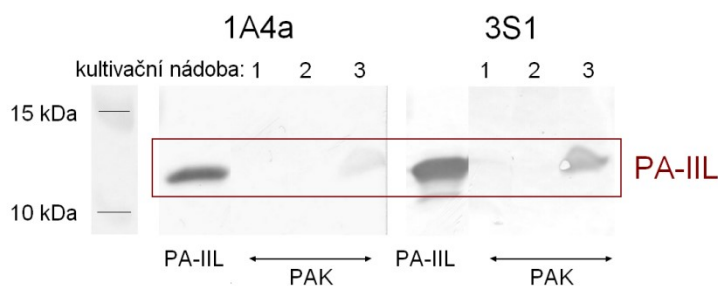
- exprese PA-IIL v čase, resp. závislost na růstové fázi kultury (obrázek 19, str. 50)
- různé druhy kultivačního média: M9, PS a LB médium (obrázek 20, str. 50)
- různé druhy kultivačních nádob: uzavřená centrifugační zkumavka, Erlenmeyerova baňka, agarová plotna (obrázek 21, str. 50).



**Obrázek 19 - Membrána po imunodetekci lektinu PA-IIL.** Byla studována exprese PA-IIL v kultuře PAK v závislosti na čase a růstové fázi kultury. Kultivace probíhala v PS médiu v Erlenmeyerově baňce. Jako standard sloužil rekombinantní PA-IIL. Pro detekci byla použita frakce 1A4a.



**Obrázek 20 – Membrána po imunodetekci lektinu PA-IIL.** Byla studována rozdílná exprese PA-IIL v kultuře PAK v závislosti na různých druzích kultivačního média: M9, PS, LB. Kultivace probíhala 14 h v Erlenmeyerově baňce. Jako standard sloužil rekombinantní PA-IIL. Pro detekci byly použity frakce 3S1 a 1A4a.

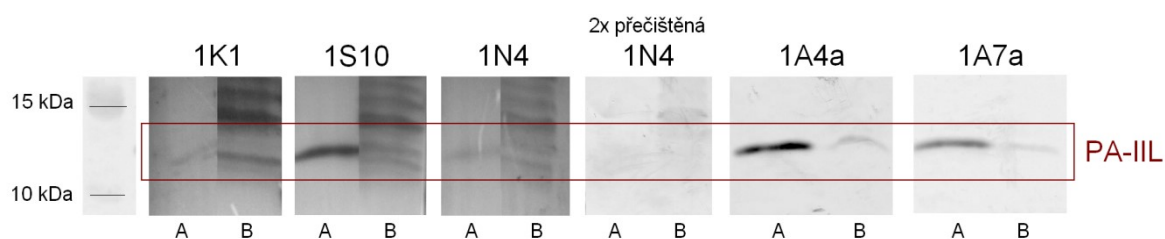


**Obrázek 21 - Membrána po imunodetekci lektinu PA-IIL.** Byla studována rozdílná exprese PA-IIL v kultuře PAK v závislosti na různých druzích kultivačních nádob: (1) uzavřená centrifugační zkumavka, (2) agarová plotna, (3) Erlenmeyerova baňka. Kultivace probíhala 14 h v PS médiu. Jako standard sloužil rekombinantní PA-IIL. Pro detekci byly použity frakce 3S1 a 1A4a.

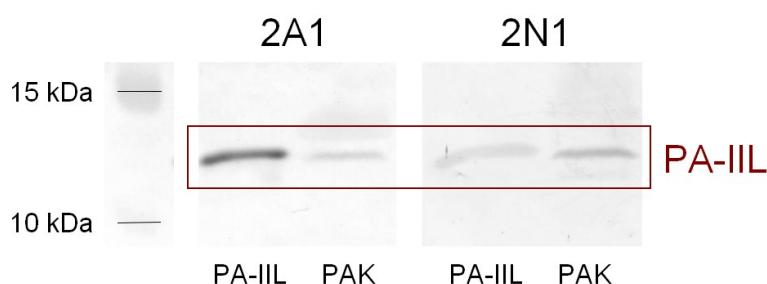
Následně byla porovnána schopnost vybraných frakcí protilátek izolovaných od slepice č. 1 rozpoznat rekombinantní PA-IIL a PA-IIL přítomný v bakteriálním lyzátu PAK. K detekci byly použity následující frakce: frakce získaná před imunizací (1K1), frakce získaná po imunizaci (1S10), frakce nezachycené na afinitní koloně (1N4, 2x přečištěná 1N4) a afinitně purifikované frakce (1A4a, 1A7a). Výsledky znázorňuje obrázek 22.

Pro srovnání byly využity vybrané frakce získané od slepice č. 2 (obrázek 23): afinitně purifikovaná (2A1) a nezachycená na afinitní koloně (2N1). Výsledky znázorňuje obrázek 23.

Kultivace PAK probíhala 14 h v PS médiu v Erlenmeyerově baňce.



**Obrázek 22 – Membrány po imunodetekci lektinu PA-IIL.** Byla ověřena produkce PA-IIL v kultuře PAK (B). Jako standard byl použit rekombinantní PA-IIL (A). K detekci byly použity frakce protilátek získané od slepice č. 1: 1K1, 1R10, 1N4, 2x přečištěná 1N4, 1A4a a 1A7a



**Obrázek 23 - Membrány po imunodetekci lektinu PA-IIL.** Byla ověřena produkce PA-IIL v kultuře PAK. Jako standard byl použit rekombinantní PA-IIL. K detekci byly použity frakce protilátek získané od slepice č. 2: 2N1 a 2A1.

## 4.5 Adhezní testy

Byl studován vliv anti-PA-IIL slepičích protilátek a multivalentních inhibitorů na bázi fukosy na schopnost adheze bakterií PAK k povrchu plicních epitelálních buněk CuFi-1 či NuLi-1. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez protilátek či inhibitorů).

Plicní epitelální buňky (CuFi-1, NuLi-1) a bakteriální buňky (PAK) byly pro vizualizaci a kvantifikaci fluorescenčně značeny pomocí sloučenin PKH67 (CuFi-1, NuLi-1) a PKH26 (PAK). Míra adherence byla vyhodnocena jako poměr relativní fluorescence PAK/CuFi-1 či PAK/NuLi-1.

### 4.5.1 Adhezní testy se slepičími protilátkami

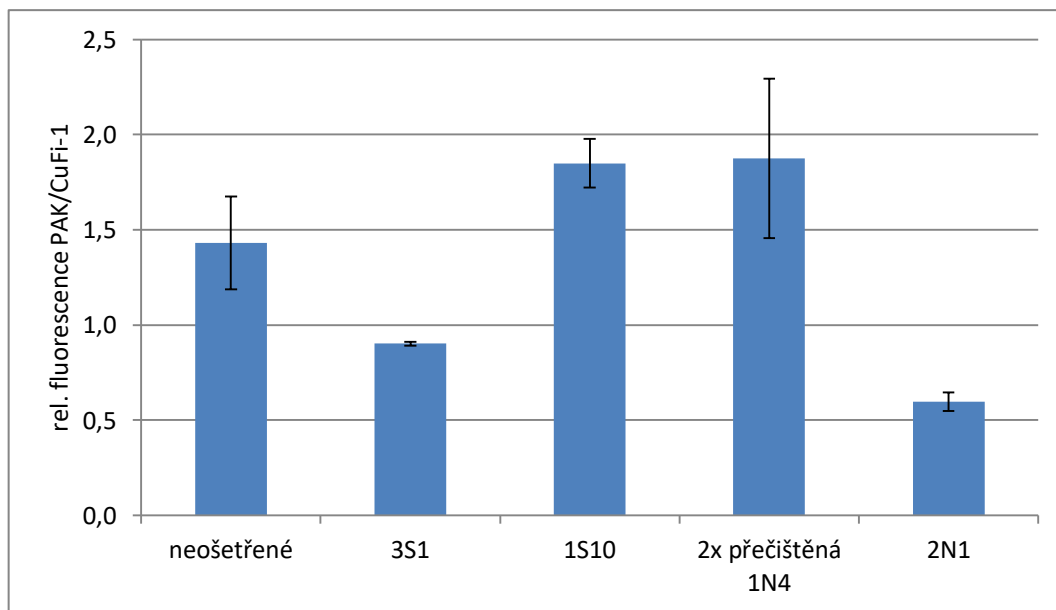
Byl testován vliv slepičích protilátek na adherenci PAK k buňkám plicního epitelu CuFi-1 a NuLi-1. Cílem bylo srovnat efekt různých anti-PA-IIL protilátek s jinými frakcemi IgY. Koncentrace protilátek (resp. celkového proteinu) v jamce byla vždy 1 mg/ml.

Afinitně purifikované frakce bylo z důvodu jejich nízké koncentrace potřeba doplnit na koncentraci 1 mg/ml jinými frakcemi (předimunizační či nezachycenou), případně BSA.

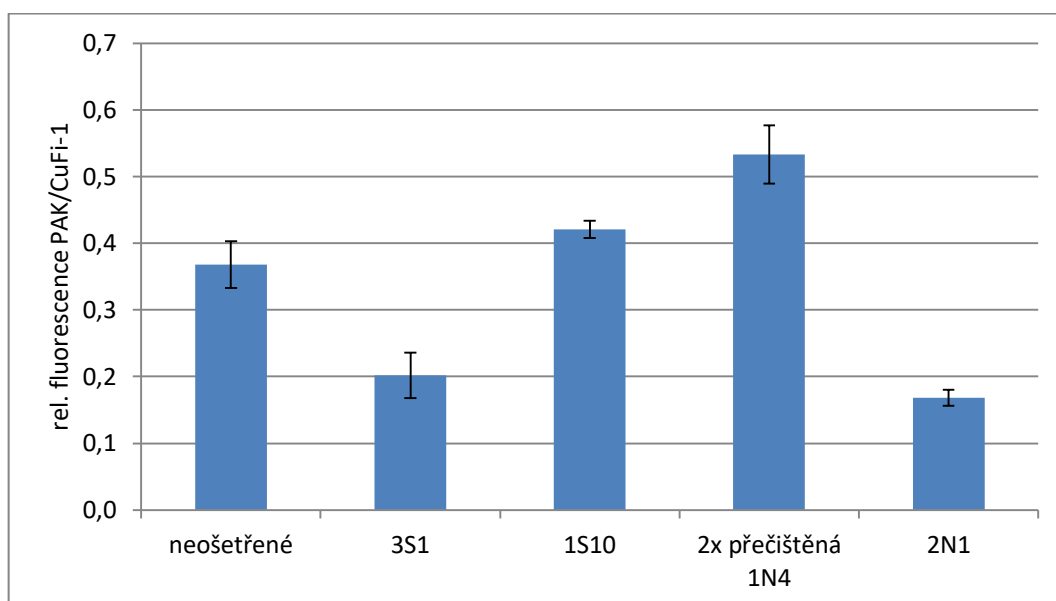
#### 4.5.1.1 Srovnání efektu vybraných frakcí na původní vs. nové buněčné linie

Byl porovnán efekt vybraných frakcí protilátek na adherenci PAK na původní a nové buněčné linie (CuFi-1, NuLi-1). Původní linie byly již delší dobu k dispozici pro práci na katedře (vysoké množství subkulturací), nové linie byly dodány od ATCC a rozpěstovány (nízké množství subkulturací). Byl srovnáván vliv dvou poimunizačních frakcí (3S1, 1S10) a dvou nezachycených frakcí (2N1, 2x přečištěná 1N4) na tyto buněčné linie.

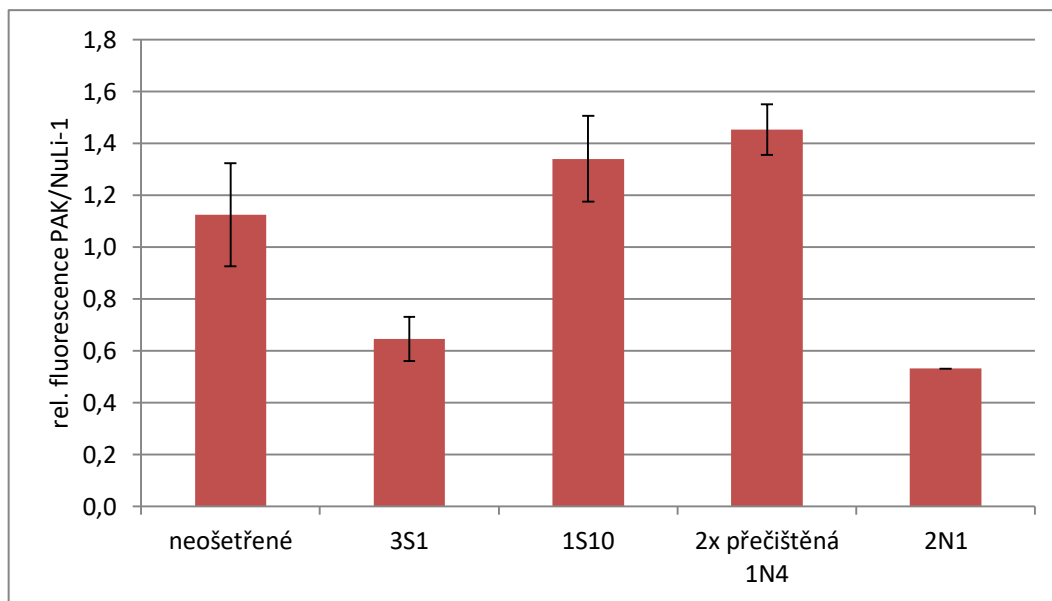
Výsledky pro buněčnou linii CuFi-1 zobrazuje obrázek 24 a 25 (str. 53), pro NuLi-1 obrázek 26 a 27 (str. 54).



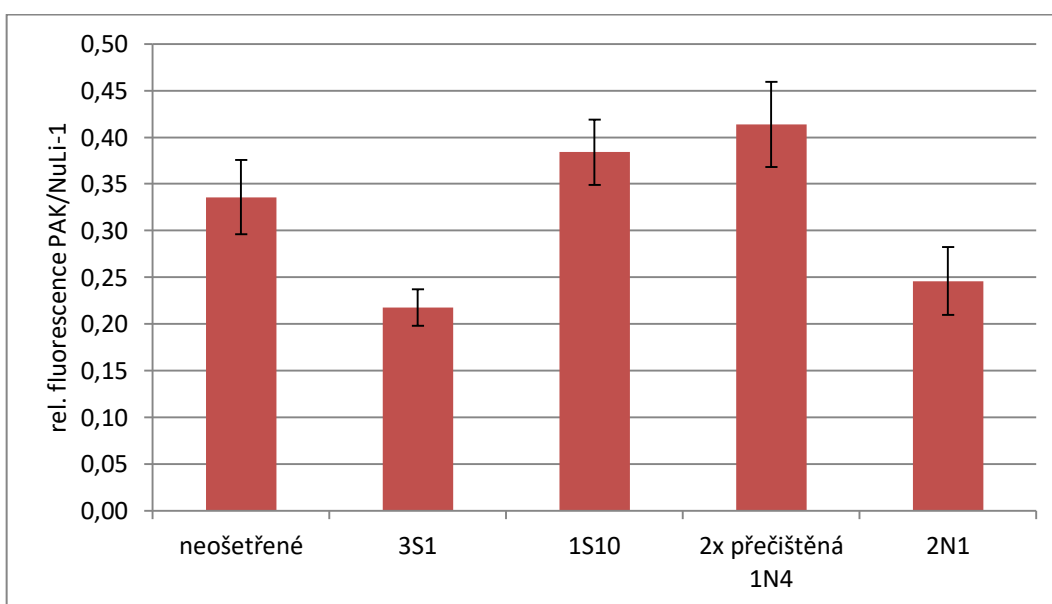
**Obrázek 24 - Relativní adherence PAK na novou buněčnou linii CuFi-1.** Výsledky jsou znázorněny jako poměr relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, gain 160) na fluorescenci CuFi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, gain 141). Byl testován efekt IgY frakcí 3S1, 1S10, 2x přečištěné 1N4 a 2N1. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přidavku protilátek).



**Obrázek 25 - Relativní adherence PAK na původní buněčnou linii CuFi-1.** Výsledky jsou znázorněny jako poměr relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, gain 160) na fluorescenci CuFi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, gain 141). Byl testován efekt IgY frakcí 3S1, 1S10, 2x přečištěné 1N4 a 2N1. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přidavku protilátek).



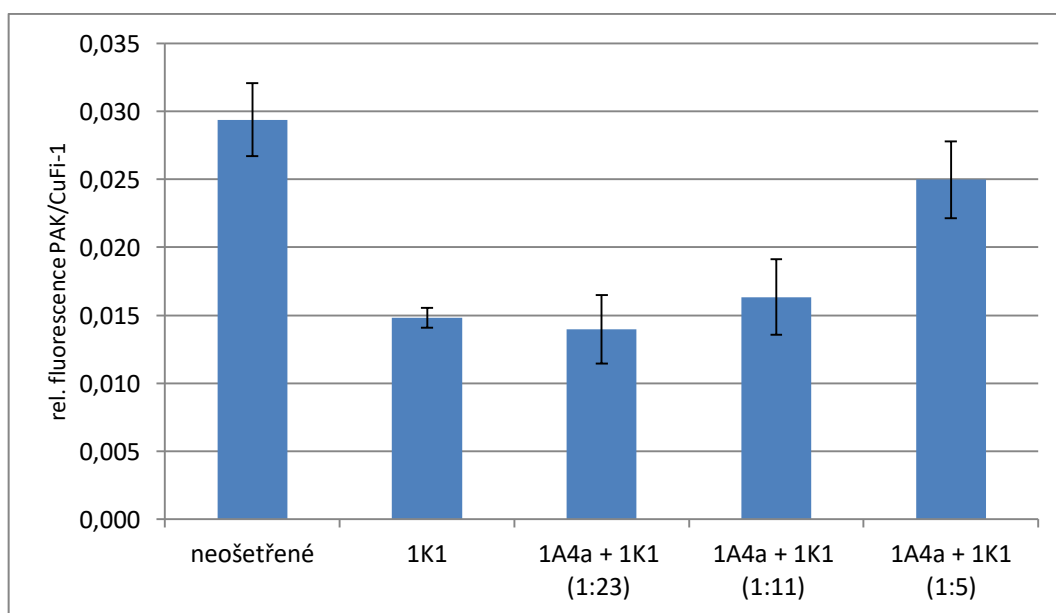
**Obrázek 26 - Relativní adherence PAK na novou buněčnou linii NuLi-1.** Výsledky jsou znázorněny jako poměr relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, gain 160) na fluorescenci NuLi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, gain 141). Byl testován efekt IgY frakcí 3S1, 1S10, 2x přečištěné 1N4 a 2N1. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přidavku protilátek).



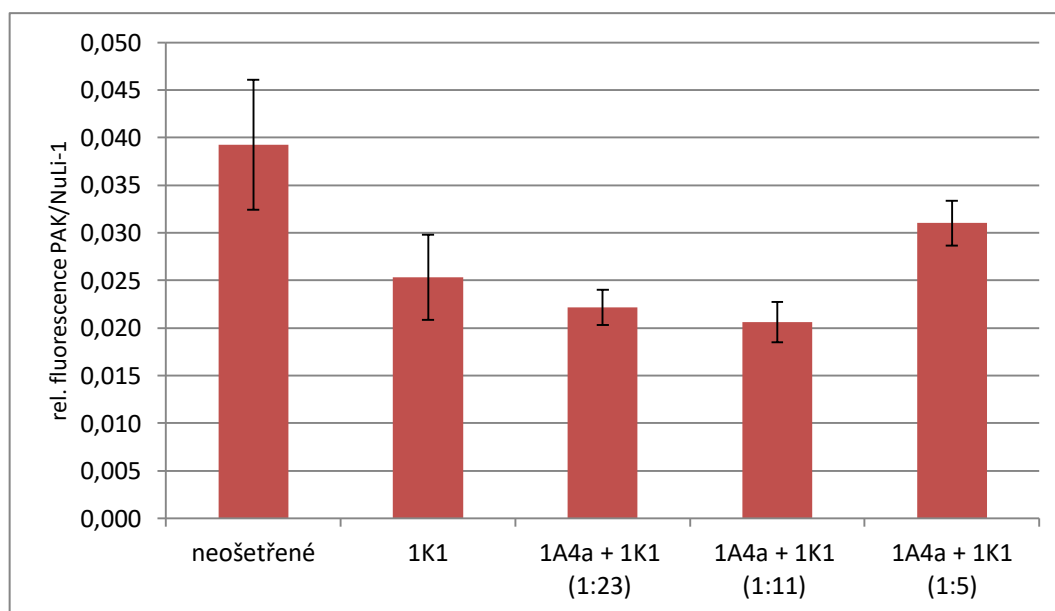
**Obrázek 27 - Relativní adherence PAK na původní buněčnou linii NuLi-1.** Výsledky jsou znázorněny jako poměr relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, gain 160) na fluorescenci NuLi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, gain 141). Byl testován efekt IgY frakcí 3S1, 1S10, 2x přečištěné 1N4 a 2N1. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přidavku protilátek).

#### 4.5.1.2 Adhezní testy s afinitně purifikovanými frakcemi

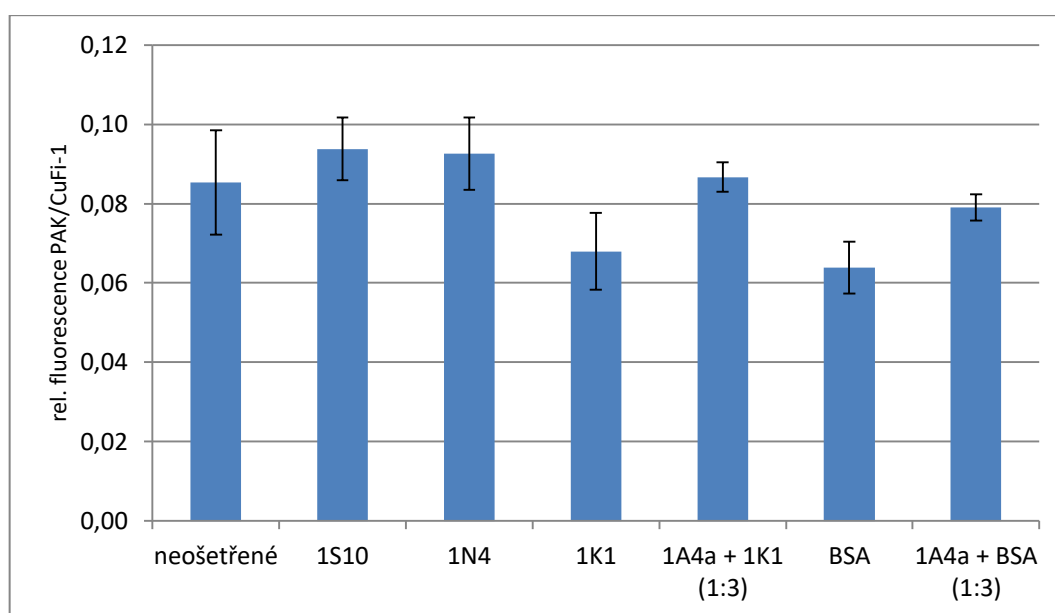
Byl srovnán efekt protilátek izolovaných od slepice č. 1: frakce získaná před imunizací (1K1), frakce získaná po imunizaci (1S10), frakce nezachycená na afinitní koloně (1N4) a afinitně purifikovaná frakce (1A4a). Frakce 1A4a byla v různých poměrech mísená s frakcí 1K1 (CuFi-1: obrázek 28; NuLi-1: obrázek 29, str. 56). Dále byl porovnán efekt frakce získané po imunizaci (1S10), frakce nezachycené na koloně (1N4) a frakce 1A4a v poměru 1:3 s frakcí 1K1 či BSA (CuFi-1: obrázek 30, str. 56; NuLi-1: obrázek 31, str. 57).



**Obrázek 28 - Relativní adherence PAK na buňky plicního epitelu CuFi-1.** Výsledky jsou znázorněny jako poměr relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, gain 140) na fluorescenci CuFi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, gain 143). Byl testován efekt IgY frakcí izolovaných z vajec slepice č. 1: 1K1, 1A4a smíšená v různých poměrech s 1K1 na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Poměr 1:11 odpovídá přibližné míře čistoty stanovené na ELISA. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přidavku protilátek).

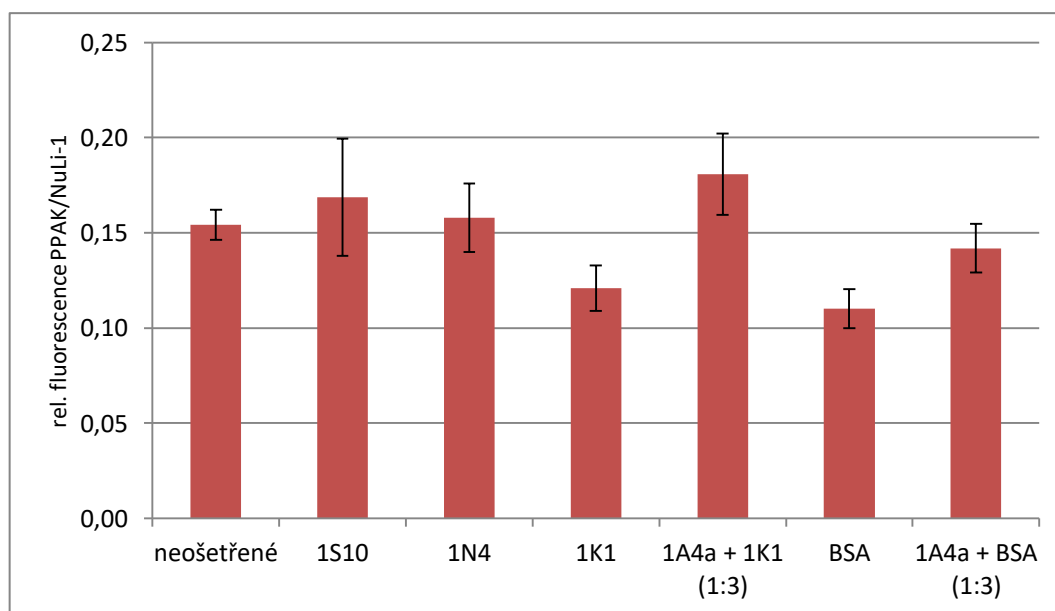


**Obrázek 29 - Relativní adherence PAK na buňky plicního epitelu NuLi-1.** Výsledky jsou znázorněny jako poměr relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, gain 140) na fluorescenci NuLi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, gain 165). Byl testován efekt IgY frakcí izolovaných z vajec slepice č. 1: 1K1, 1A4a smíšená v různých poměrech s 1K1 na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Poměr 1:11 odpovídá přibližné míře čistoty stanovené na ELISA. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přidavku protilátek).



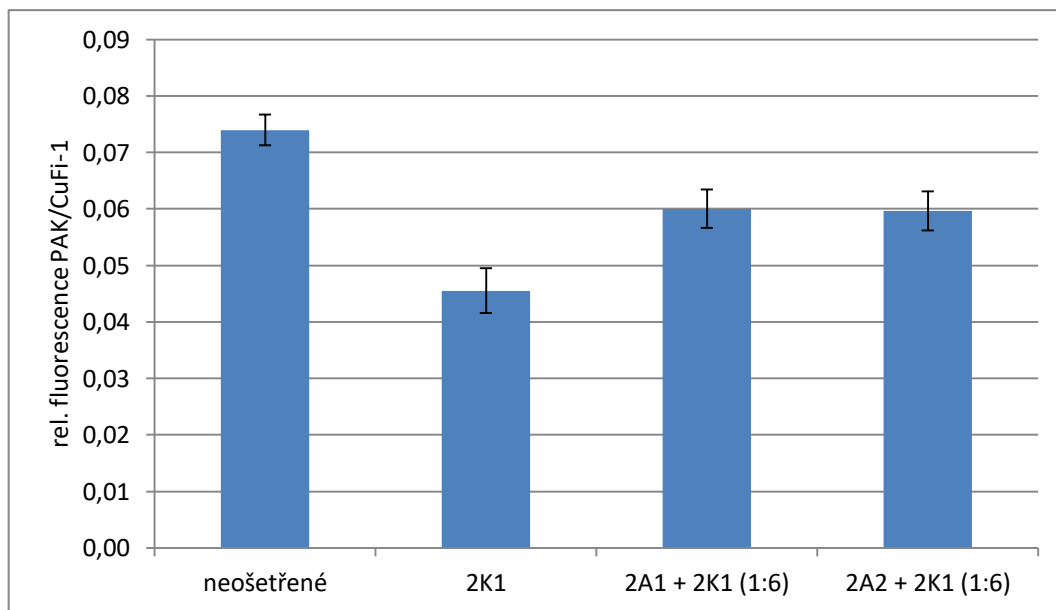
**Obrázek 30 - Relativní adherence PAK na buňky plicního epitelu CuFi-1.** Výsledky jsou znázorněny jako poměr relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, gain 160) na fluorescenci CuFi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, gain 139). Byl testován efekt IgY frakcí izolovaných z vajec slepice č. 1: 1S10, 1N4, 1A4a smíšená v poměru 1:3 s 1K1 či BSA na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přidavku protilátek).



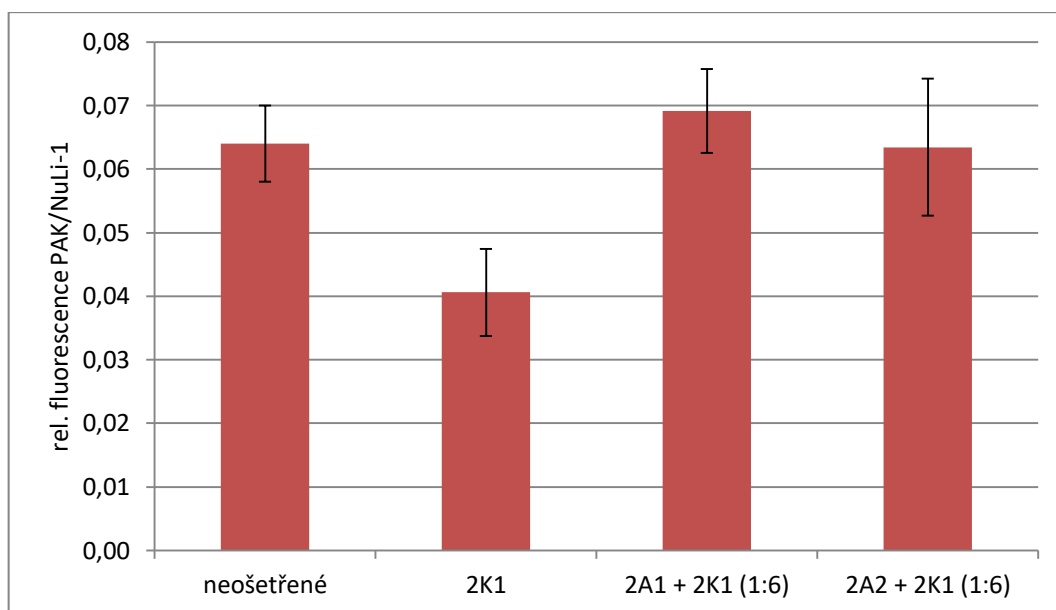


**Obrázek 31 - Relativní adherence PAK na buňky plicního epitelu NuLi-1.** Výsledky jsou znázorněny jako poměr relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, gain 160) na fluorescenci NuLi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, gain 139). Byl testován efekt IgY frakcí izolovaných z vajec slepice č. 1: 1S10, 1N4, 1A4a smíšená v poměru 1:3 s 1K1 či BSA na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přidavku protilátek).

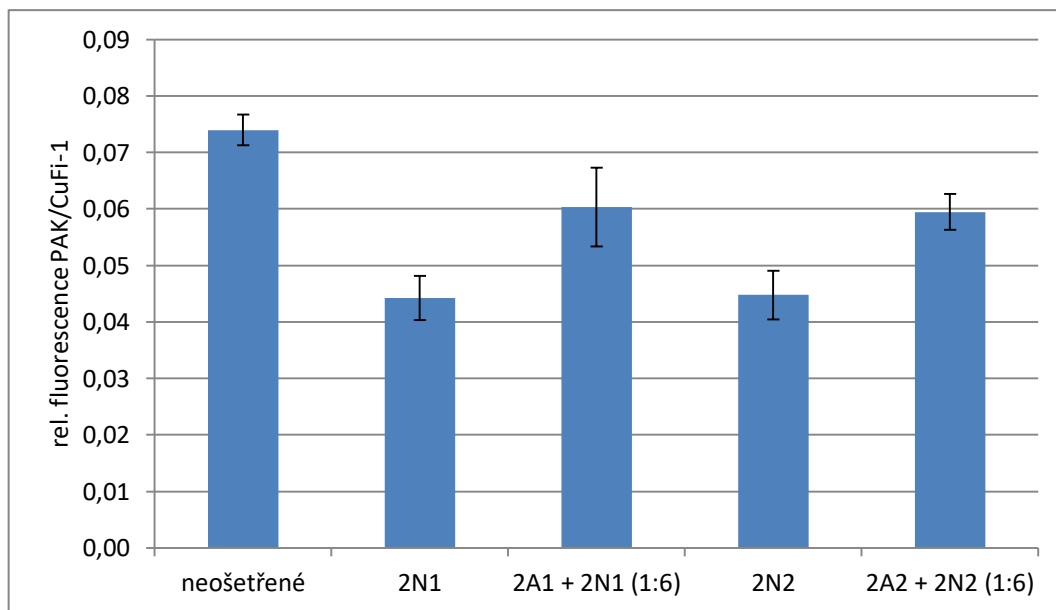
Pro srovnání byly testovány frakce izolované od slepice č. 2: frakce získaná před imunizací (2K1), frakce nezachycené na afinitní koloně (2N1, 2N2) a afinitně purifikované frakce (2A1, 2A2). Frakce 2A1 a 2A2 byly v poměru 1:6 míseny nejprve s frakcí 2K1 (CuFi-1: obrázek 32, str. 58; NuLi-1: obrázek 33, str. 58) a následně s příslušnými nezachycenými frakcemi (CuFi-1: obrázek 34, str. 59; NuLi-1: obrázek 35, str. 59).



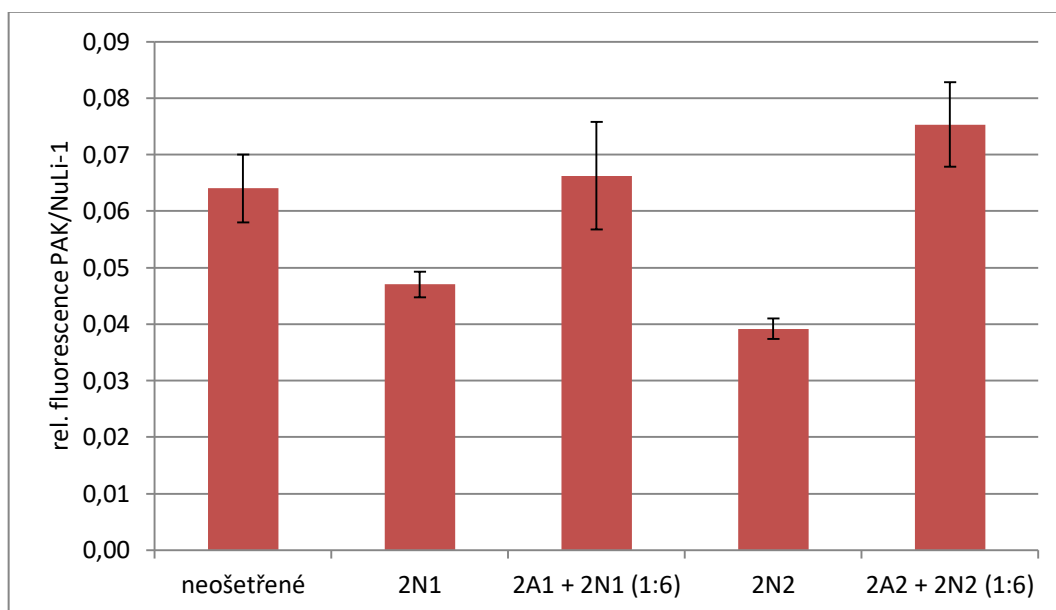
**Obrázek 32 - Relativní adherence PAK na buňky plicního epitelu CuFi-1.** Výsledky jsou znázorněny jako poměr relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, gain 140) na fluorescenci CuFi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, gain 122). Byl testován efekt IgY frakcí izolovaných z vajec slepice č. 2: 2K1, 2A1 a 2A2 smíšené v poměru 1:6 s 2K1 na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Poměr 1:6 odpovídá přibližné míře čistoty stanovené na ELISA. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přidavku protilátek).



**Obrázek 33 - Relativní adherence PAK na buňky plicního epitelu NuLi-1.** Výsledky jsou znázorněny jako poměr relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, gain 140) na fluorescenci NuLi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, gain 155). Byl testován efekt IgY frakcí izolovaných z vajec slepice č. 2: 2K1, 2A1 a 2A2 smíšené v poměru 1:6 s 2K1 na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Poměr 1:6 odpovídá přibližné míře čistoty stanovené na ELISA. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přidavku protilátek).



**Obrázek 34 - Relativní adherence PAK na buňky plicního epitelu CuFi-1.** Výsledky jsou znázorněny jako poměr relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, gain 140) na fluorescenci CuFi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, gain 122). Byl testován efekt IgY frakcí izolovaných z vajec slepice č. 2: 2N1, 2N2, 2A1 a 2A2 smíšené s příslušnými nezachycenými frakcemi v poměru 1:6 na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Poměr 1:6 odpovídá přibližné míře čistoty stanovené na ELISA. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přidavku protilátek).

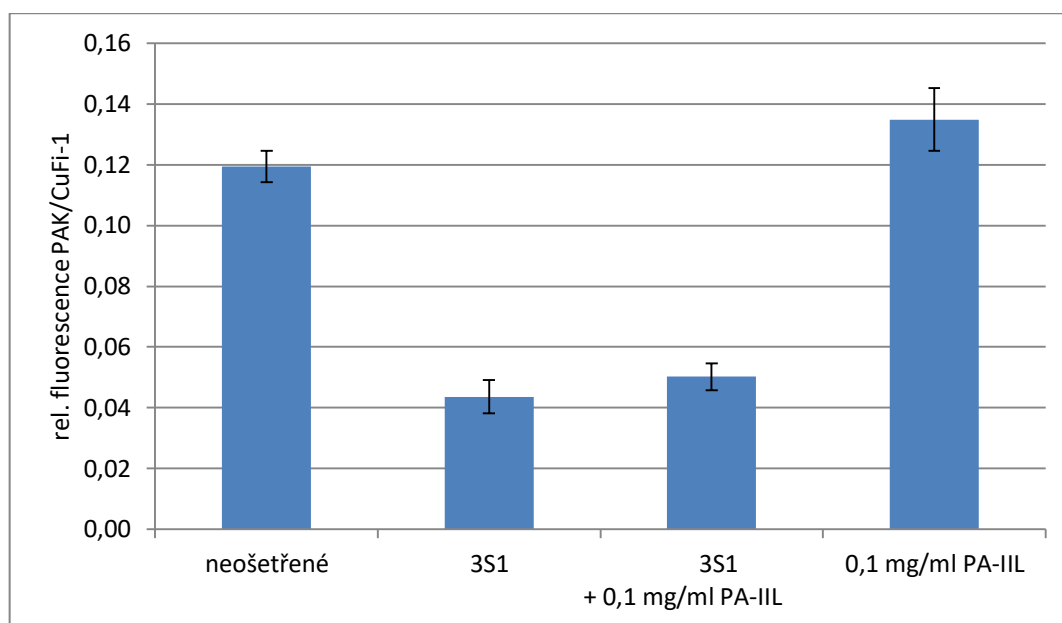


**Obrázek 35 - Relativní adherence PAK na buňky plicního epitelu NuLi-1.** Výsledky jsou znázorněny jako poměr relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, gain 140) na fluorescenci NuLi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, gain 155). Byl testován efekt IgY frakcí izolovaných z vajec slepice č. 2: 2N1, 2N2, 2A1 a 2A2 smíšené s příslušnými nezachycenými frakcemi v poměru 1:6 na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Poměr 1:6 odpovídá přibližné míře čistoty stanovené na ELISA. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přidavku protilátek).

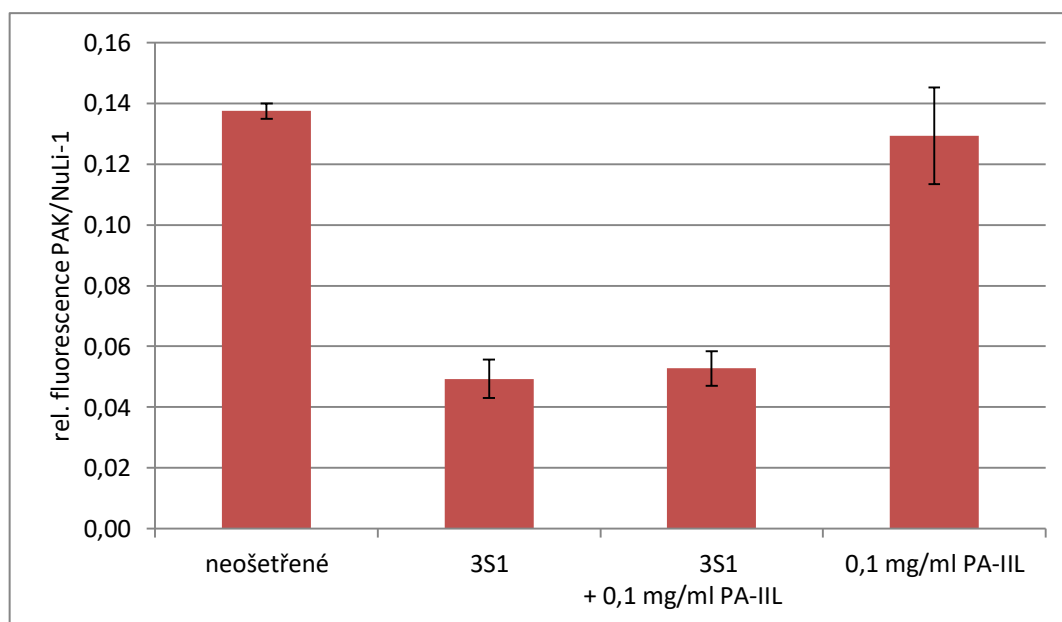
#### 4.5.1.3 Adhezní testy ověřující specifitu frakce 3S1

Specifita frakce 3S1 (získaná po imunizaci) byla studována pomocí vysycení frakce antigenem PA-IIL v koncentraci 0,1 mg/ml.

Výsledky pro CuFi-1 jsou znázorněny na obrázku 36, pro NuLi-1 na obrázku 37 (str. 61).



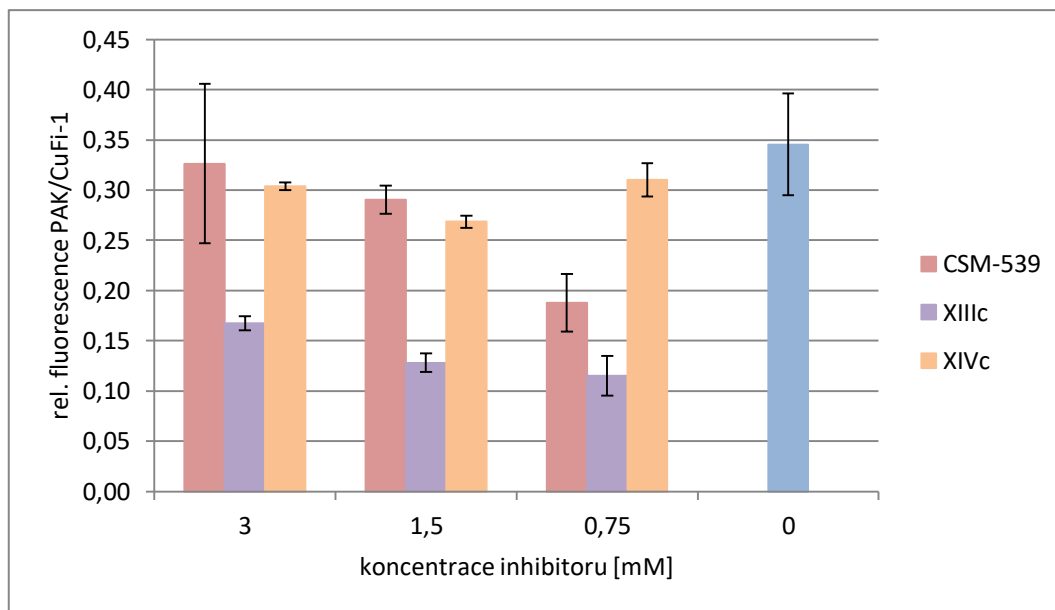
**Obrázek 36 - Relativní adherence PAK na buňky plicního epitelu CuFi-1.** Výsledky jsou znázorněny jako poměr relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, gain 160) na fluorescenci CuFi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, gain 159). Byla testována specifita frakce 3S1 pomocí jejího vysycení antigenem PA-IIL (0,1 mg/ml). Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přídavku PA-IIL a protilátek).



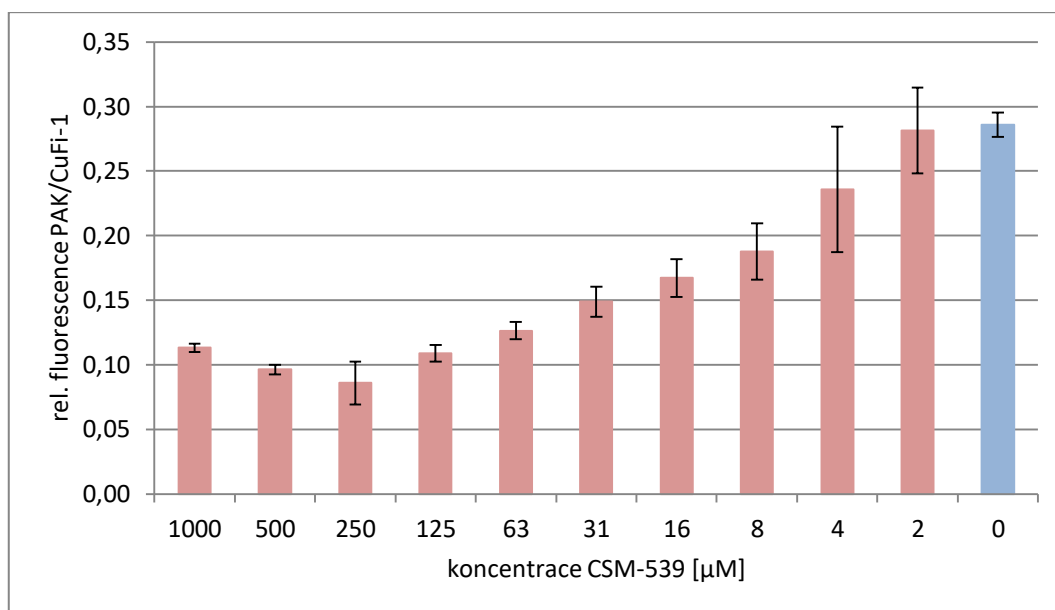
**Obrázek 37 - Relativní adherence PAK na buňky plicního epitelu NuLi-1.** Výsledky jsou znázorněny jako poměr relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, gain 160) na fluorescenci NuLi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, gain 159). Byla testována specifita frakce 3S1 pomocí jejího vysycení antigenem PA-IIL (0,1 mg/ml). Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přídavku PA-IIL protilátek).

#### 4.5.2 Adhezní testy s multivalentními inhibitory na bázi fukosy

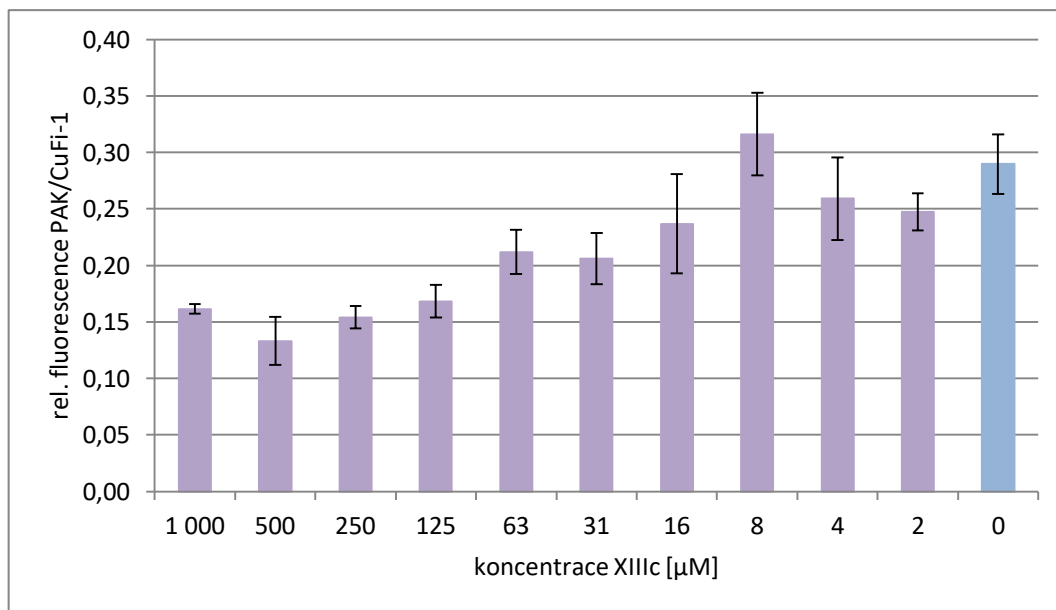
Na buněčné linii CuFi-1 byly testovány 3 různé anti-PA-IIL inhibitory s terminálními fukosami s označením: CSM-539, XIIIc a XIVc. Nejprve byly použity koncentrace inhibitorů: 3; 1,5 a 0,75 mM (obrázek 38, str. 62), na základě pozorovaného trendu byl následně testován jejich efekt v koncentračním rozmezí 1 mM – 2  $\mu$ M (obrázek 39, str. 62; obrázek 40 a 41, str. 63).



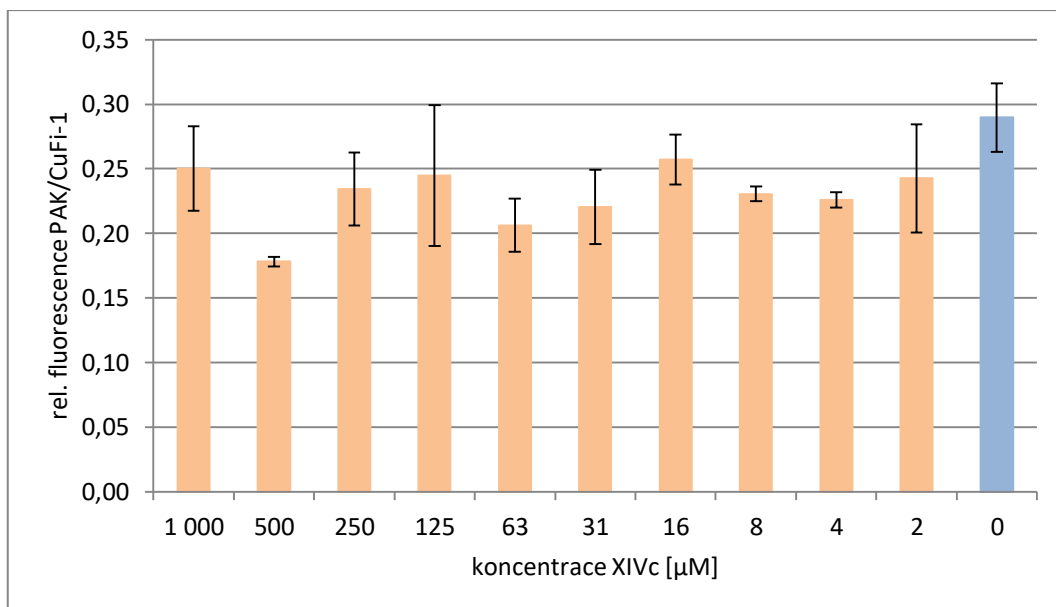
**Obrázek 38 - Relativní adherence PAK na buňky plicního epitelu CuFi-1.** Výsledky jsou znázorněny jako poměr relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, gain 160) na fluorescenci CuFi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, gain 140). Byly testovány vlivy multivalentních anti-PA-IIL inhibitorů na bázi fukosy: CSM-539, XIIIc a XIVc (3; 1,5 a 0,75 mM) na adhezi PAK. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přidavku inhibitoru).



**Obrázek 39 - Relativní adherence PAK na buňky plicního epitelu CuFi-1.** Výsledky jsou znázorněny jako poměr relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, gain 160) na fluorescenci CuFi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, gain 132). Byl testován vliv anti-PA-IIL inhibitoru CSM-539 v koncentračním rozmezí 1 mM – 2 μM na adhezi PAK. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přidavku inhibitoru).



**Obrázek 40 - Relativní adherence PAK na buňky plicního epitelu CuFi-1.** Výsledky jsou znázorněny jako poměr relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, gain 160) na fluorescenci CuFi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, gain 140). Byl testován vliv anti-PA-IIL inhibitoru XIIIc v koncentračním rozmezí 1 mM – 2 μM na adhezi PAK. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přídavku inhibitoru).



**Obrázek 41 - Relativní adherence PAK na buňky plicního epitelu CuFi-1.** Výsledky jsou znázorněny jako poměr relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, gain 160) na fluorescenci CuFi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, gain 140). Byl testován vliv anti-PA-IIL inhibitoru XIVc v koncentračním rozmezí 1 mM – 2 μM na adhezi PAK. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přídavku inhibitoru).

## 5 Diskuze

Genetické onemocnění cystická fibrosa je způsobené mutacemi *CFTR* genu, který kóduje stejnojmenný protein s funkcí chloridového kanálu. V důsledku absence či defektu tohoto proteinu dochází k ovlivnění transportu solí a vody v epitelálních buňkách. Pro pacienty s CF jsou kritické zejména časté bakteriální infekce dýchacího ústrojí, k nimž jsou náchylní z důvodu přítomnosti zahuštěného hlenu a pozměněné glykosylace v plicích. Nejčastějším patogenem způsobujícím tyto infekce je bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, k jejíž patogenitě přispívá mimo jiné i lektin PA-IIL. Tento lektin, který s vysokou afinitou váže L-fukosu, se účastní adheze bakterie k buňkám hostitele a je důležitou složkou při tvorbě biofilmu. Cílem této práce bylo ověření schopnosti vybraných látek zabránit adhezenci PAK k buňkám plicního epitelu. Byly testovány nespecifické a specifické slepičí imunoglobuliny Y a multivalentní inhibitory na bázi fukosy.

Specifické slepičí IgY se zdají být slibnou alternativou či doplňkem antibiotické léčby. Jejich profylaktické využití u lidí a zvířat je předmětem mnoha studií zabývajících se celou řadou bakteriálních, případně i některých virových či plísňových infekcí. Z bakteriálních infekcí jsou to např. infekce způsobené bakteriemi *Helicobacter pylori*, *Salmonella enteritidis*, *Chlostridium difficile* či *Streptococcus mutans*<sup>81</sup>. Orálně podávané IgY proti *Pseudomonas aeruginosa* vykazaly v klinických studiích protektivní efekt a jejich užívání po dobu několika let nevyvolalo žádné negativní vedlejší účinky<sup>61,62</sup>.

Z vaječného žloutku slepice před imunizací a po imunizaci antigenem PA-IIL ΔG/fuc byly izolovány frakce IgY. Metodou ELISA byla ověřena schopnost izolovaných frakcí rozpoznat antigen PA-IIL. Frakce získaná před imunizací vykazovala dle očekávání velmi nízkou reaktivitu s antigenem, avšak frakce izolované z vajec slepice po aplikaci prvního imunizačního schématu též nevykazovaly významné zvýšení reaktivity proti tomuto antigenu. Bylo proto přistoupeno k podporující imunizační dávce, po níž došlo k výraznému zvýšení reaktivity izolovaných frakcí, a tedy i vyššímu obsahu specifických anti-PA-IIL protilátek ve žloutku.

Pro izolaci těchto specifických protilátek metodou afinitní chromatografie byly vybrány frakce s nejvyšší reaktivitou, které byly spojeny. Kvůli omezení nespecifické vazby přes glykosylace IgY byla tato frakce inkubována s afinitním sorbentem s navázaným antigenem PA-IIL v přítomnosti L-fukosy, aby došlo k vysycení aktivních míst navázaného PA-IIL. Výtěžky afinitní chromatografie se v této práci pohybovaly



přibližně mezi 0,6-0,9 %. Reaktivita získaných afinitně purifikovaných frakcí i frakcí nezachycených na afinitní koloně byla ověřena metodou ELISA. Hlavní afinitně purifikované frakce (s nejvyšším obsahem proteinů) vykazovaly reaktivitu přibližně 11x vyšší než směsná frakce aplikovaná na afinitní kolonu. Z nižších hodnot výtěžků a částečně zvýšené reaktivity nezachycených frakcí (oproti frakci získané před imunizací) vyplývá, že touto metodou pravděpodobně nedošlo k úplné izolaci všech specifických IgY z původní frakce. To mohlo být způsobeno překročením kapacity kolony. Pro další experimenty byly vybrány afinitně purifikované frakce s nejvyšší reaktivitou a nejvyšším obsahem proteinů. Byla též připravena 2x přečištěná nezachycená frakce, která byla opakovanou inkubací s afinitním sorbentem s navázaným antigenem PA-IIL v přítomnosti L-fukosy zbavena všech anti-PA-IIL protilátek.

V této práci byly v jednotlivých metodách pro srovnání použity i vybrané frakce IgY získané od dalších dvou slepic, neboť imunitní systém každého zvířete je unikátní a dokáže vytvořit různé zastoupení specifických protilátek proti odlišným epitopům.

Pro další experimenty a lepší charakterizaci vybraných IgY frakcí byla porovnána jejich reaktivita s různě modifikovaným rekombinantním lektinem PA-IIL. Pro toto srovnání byly využity dvě metody, Western blot s následnou imunodetekcí IgY frakcemi a ELISA. Rozdíl těchto dvou imunochemických metod je především ve stavu proteinu (antigenu), ve kterém se při detekci nachází. Western blot navazuje na SDS-PAGE, kde v přítomnosti SDS dochází k denaturaci PA-IIL a změnám v jeho nativní prostorové struktuře. Při metodě ELISA si antigen naopak zachovává svou nativní strukturu. Z tohoto důvodu byly pro Western blot použity pouze dvě modifikace PA-IIL, které se liší svou primární strukturou, a to neupravený PA-IIL a mutantní PA-IIL  $\Delta$ G/fuc (delece kyseliny glutamové). Pro srovnání na ELISA byl navíc použit i PA-IIL inaktivovaný EDTA, tzn. bez vápenatých iontů, které zprostředkovávají vazbu sacharidu, struktura lektinu by však měla být zachována. U obou metod bylo patrné, že IgY frakce, které obsahují specifické anti-PA-IIL protilátky, vykazují nejvyšší reaktivitu s neupraveným PA-IIL. Reaktivita s inaktivovaným PA-IIL byla obecně nižší. Neočekávaný výsledek byl zaznamenán na ELISA u interakce afinitně purifikovaných frakcí s PA-IIL  $\Delta$ G/fuc, neboť jejich reaktivita s tímto antigenem byla výrazně nižší než s oběma zbývajících modifikacemi PA-IIL. Tento efekt by mohl být vysvětlen tím, že delece aminokyseliny může ovlivnit sbalení a strukturu PA-IIL  $\Delta$ G/fuc, a vzhledem k tomu, že na afinitní koloně byl imobilizován PA-IIL  $\Delta$ G/fuc pouze ve výrazně nižším zastoupení než PA-IIL (z důvodu spojení

afinitních sorbentů ze dvou kolon), získané afinitně purifikované frakce pravděpodobně mohou rozpoznávat jiné epitopy. Na základě výsledků byl pro další experimenty jako antigen používán neupravený PA-IIL.

Pro ověření přítomnosti PA-IIL v bakteriální kultuře kontrolního kmenu PA (PAK, ST 1763) bylo nutno zjistit, kdy a za jakých podmínek k expresi tohoto lektinu dochází. Vzhledem k tomu, že v předchozích studiích bylo ukázáno, že PA-IIL začíná bakterie produkovat až ve stacionární fázi svého růstu<sup>44</sup>, bylo nutné nejprve stanovit růstovou křivku PAK. Byl porovnán růst kultury v LB a PS médiu v Erlenmeyerově baňce při 37 °C. V obou médiích byl průběh křivky srovnatelný a bylo zjištěno, že kultura přechází do stacionární fáze přibližně v 8. hodině kultivace. Během kultivace v PS médiu byly též v určitých časových intervalech odebrány vzorky pro následné ověření přítomnosti PA-IIL metodou Western blot s následnou imunodetekcí. Výsledky ukazují, že PA-IIL je slabě detekovatelný od 13. hodiny kultivace. Dále bylo též důležité ověřit, zda exprese PA-IIL závisí na druhu kultivačního média a kultivační nádoby. Kultury pro tyto experimenty byly kultivovány 14 h, neboť tento čas byl po předchozím pozorování vyhodnocen jako optimální. Byla studována exprese PA-IIL v kultuře kultivované v M9, PS a LB médiu. V prvních dvou zmíněných médiích došlo ke srovnatelné expresi PA-IIL, v LB médiu byl lektin exprimován jen slabě. PS médium bylo proto vyhodnoceno jako vhodné pro další kultivace. Bylo též ověřeno, že různé kultivační nádoby mají vliv na expresi tohoto lektinu. V lyzátech PAK kultivovaných v uzavřené centrifugační zkumavce a na agarové plotně nebyl PA-IIL, na rozdíl od kultivace v Erlenmeyerově baňce, detekován. Pravděpodobně zde hraje roli tvar nádoby a aerace kultury během kultivace. S přihlédnutím k faktu, že PA patří mezi fakultativně anaerobní bakterie, je pravděpodobné, že kultivace v Erlenmeyerově baňce bude optimální variantou, z tohoto důvodu byla tato kultivační nádoba používána pro další experimenty.

Míra adherence PAK na epiteliální buňky (tzv. adhezní test) v přítomnosti vybraných IgY frakcí byla studována *ex vivo* s použitím imortalizované plicní epiteliální bronchiální linie CuFi-1 (izolované od CF pacienta) a NuLi-1 (izolované od zdravého dárce). Buněčné linie a PAK byly pro vizualizaci a kvantifikaci fluorescenčně označeny s využitím PKH barviv (PKH67: CuFi-1 a NuLi-1, PKH26: PAK). Experimenty byly prováděny ve speciálních destičkách s povrchem upraveným pro adherentní linie (Corning CellBind®). Epiteliální buňky tvoří na dně jamek monovrstvu, která buňky chrání před odmytím během jednotlivých kroků experimentu a měla by též simulovat reálnou situaci v plicích.

Jednotlivá experimentální uspořádání byla graficky vyhodnocena jako poměr relativní fluorescence PAK/CuFi-1 či PAK/NuLi-1 (spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro). Měření bylo vždy doplněno mikroskopickým pozorováním pro zhodnocení úspěšnosti fluorescenčního značení a provedení samotného experimentu.

Jako první byl srovnán vliv vybraných IgY frakcí na adherenci PAK na původní vs. nové buněčné linie pro zhodnocení relevance experimentů provedených na buňkách s vysokým množstvím subkulturací, neboť u těchto buněk může postupem času docházet k řadě změn (např. změny morfologie, rychlosti růstu, odezvy na stimuly)<sup>82</sup>. Z výsledků srovnávacího adhezního testu je zřejmé, že ani u jedné linie (CuFi-1, NuLi-1) nedošlo k fenotypovým změnám, které by vedly k ovlivnění adherence PAK na tyto buňky v přítomnosti či nepřítomnosti protilátek. Tento modelový systém zřejmě není ovlivněn počtem subkulturací daných linií.

Vzhledem k tomu, že byl v předchozích studiích prokázán protektivní vliv IgY frakcí na stejném buněčném modelu<sup>50</sup>, byly v této práci testovány vybrané IgY frakce od různých slepic. Nejprve byl srovnán efekt dvou frakcí získaných po imunizaci, dále efekt několika frakcí nezachycených na afinitní koloně. Ani v jednom případě však protilátky nevykazovaly jednoznačný efekt. Frakce izolovaná z vajec po imunizaci, která byla izolována v této práci, nevykázala na adhezním testu žádný efekt, přičemž stejný typ frakce získaný od jiné slepice vykázal značný protektivní vliv. Jedna z nezachycených frakcí znatelně snižovala adherenci PAK, další dvě nikoliv. Z tohoto důvodu bylo nutno ověřit specifitu protilátek a otestovat na adhezních testech získané afinitně purifikované frakce. Tyto frakce však musely být z důvodu jejich nízké koncentrace spojeny s jinými frakcemi (frakce získané před imunizací či nezachycené frakce) či BSA na koncentraci 1 mg/ml, aby byly zachovány jednotné podmínky experimentu. Při nízké koncentraci protilátky navíc hrozí její digesce enzymy PA. Předpokladem bylo, že tyto nespecifické frakce ani BSA neovlivňují adherenci PAK. Výsledky však překvapivě ukazují opačný výsledek, a tedy že tyto frakce, které by neměly obsahovat specifické anti-PA-IIL protilátky, vykazují protektivní vliv, oproti tomu afinitně purifikované specifické anti-PA-IIL protilátky nemají žádný efekt. Srovnatelné výsledky byly pozorovány i při použití BSA. Přestože afinitně purifikované frakce vykázaly schopnost rozpoznat PA-IIL na ELISA i při imunodetekci na membráně po metodě Western blot, v *ex vivo* modelu nevykázaly inhibiční efekt. Absence protektivního efektu IgY by mohla souviset se způsobem přípravy afinitní kolony, neboť při imobilizaci PA-IIL mohlo dojít k jeho

kovalentní vazbě na nosič tak, že aktivní centrum bylo orientováno směrem k matici nosiče. Vzhledem k tomu, že PA-IIL vykazuje afinitu i vůči galaktose, jejíž polymer tvoří matici agarosového gelu, je popisovaný předpoklad pravděpodobný. To mohlo vést k zisku frakcí, které se neváží v blízkosti vazebného místa pro sacharidy, a proto lektin neinhibují. Pro příští studie bude nutné provést imobilizaci antigenu v přítomnosti L-fukosy.

Pro ověření výše uvedeného předpokladu byla použita vybraná frakce snižující adherenci PAK získaná po imunizaci, která byla při experimentu smísena s molárním nadbytkem PA-IIL z důvodu zablokování specifické protilátky zastoupené v této směsné frakci. Tento experiment však ukázal, že přidaný PA-IIL nemá na sledovaný inhibiční efekt dané frakce vliv.

Všechny tyto výsledky vedou k závěru, že inhibiční efekt IgY frakcí nemůžeme připisat specifickým anti-PA-IIL protilátkám, což bylo podpořeno i faktem, že jednotlivé frakce ani skupiny frakcí nevykazují v rámci použitých experimentálních metod reprodukovatelný efekt.

Z výsledků adhezních testů však vyplývá, že některé IgY frakce (získané před imunizací, nezachycené na afinitní koloně) přesto vykazují inhibiční efekt. V předchozí práci byl vznesen předpoklad, že adherenci PAK mohou ovlivňovat protilátky proti adjuvans užívanému při imunizaci, které jsou též přítomny ve směsi protilátek izolovaných po imunizaci. Použité adjuvans obsahuje usmrcené mykobakterie, které mohou mít některé struktury a virulentní faktory obdobné s PA<sup>83</sup>. Tento předpoklad však nevysvětluje inhibiční efekt, který byl v této práci pozorovaný u frakcí získaných ještě před imunizací zvířete. Nelze však vyloučit, že se slepice již někdy s PA setkala a mohla si vytvořit protilátky proti některým jejím strukturám. Navíc je každé zvíře jedinec s unikátním imunitním systémem, proto nelze spoléhat na to, že bude na imunizaci reagovat vždy stejným způsobem. Každé zvíře může vytvořit protilátky proti jiným epitopům antigenu, z nichž některé nemusí mít inhibiční efekt. V poslední řadě je důležité zmínit, že imunoglobuliny jsou glykoproteiny a zvoleným antigenem je lektin, jenž s vysokou afinitou váže některé sacharidy na povrchu IgY (např. manosu). Sledovaný efekt protilátek může být tudíž způsoben inhibicí tohoto lektinu, a případně i jiných adhesivních struktur PA, sacharidy navázanými na molekule imunoglobulinu. Tyto efekty jsou předmětem dalšího výzkumu.

Nejednoznačné výsledky byly též pozorovány při srovnání efektu protilátek na linii CuFi-1 a NuLi-1. S přihlédnutím k pozměněné sialylaci povrchových struktur CF buněk by se na tyto buňky měly bakterie více vázat a inhibiční efekt protilátek by měl být tedy významnější u linie CuFi-1. Adherence bakterií však byla u obou linií srovnatelná, jak bylo pozorováno již v předchozí práci<sup>83</sup>.

Kvůli negativním výsledkům získaným při testování efektu anti-PA-IIL protilátek bylo též vhodné ověřit, zda PA-IIL opravdu hraje tak významnou roli jako adhesin v použitém uspořádání adhesního experimentu. Vzhledem k proměnlivosti a možným nespecifickým efektům spojeným s využitím slepičích protilátek bylo přistoupeno k testování syntetických glykomimetik, konkrétně multivalentních inhibitorů PA-IIL na bázi fukosy. Tyto inhibitory jsou složeny z jádrové molekuly, jejíž „větve“ nesou několik terminálních fukos. Zdá se, že takové sloučeniny vykazují díky své multivalenci značný inhibiční potenciál. Tetravalentní fukosové glykoklastry na bázi kalixarenu se ukázaly jako účinné antiadhezivní sloučeniny u *in vivo* myších modelů akutní plicní infekce způsobené PA, přičemž vykazovaly výrazně vyšší účinnost než samotné sacharidy ve stejné koncentraci<sup>84</sup>. V předkládané práci byly metodou adhesního testu s využitím buněčné linie CuFi-1 testovány tři různé multivalentní inhibitory: CSM-539 (tetravalentní), XIIIc a XIVc (dodekavalentní). Nejprve byl proveden screeningový experiment, který ukázal, že sloučenina XIVc pravděpodobně nevykazuje inhibiční efekt a zbývající dvě sloučeniny mají paradoxně zvyšující se inhibiční efekt se snižující se koncentrací. Toto chování inhibitorů ve vyšších koncentracích bylo pozorováno již u jiných multivalentních inhibitorů a je přisuzováno síťování bakterií prostřednictvím těchto sloučenin<sup>85</sup>. Dochází tak ke vzniku klastrů PAK adherujících k epiteliálním buňkám a nárůstu fluorescenčního signálu. Z toho důvodu byl inhibiční efekt sloučenin studován v širším koncentračním rozsahu. Výsledek těchto experimentů potvrdil předkládané trendy. Sloučenina XIVc opravdu nevykazuje téměř žádný inhibiční efekt, což je pravděpodobně dáno jejím nevhodným prostorovým uspořádáním. Další dvě sloučeniny však vykazují značný antiadhezivní potenciál. Obě sloučeniny snižují ve své nejefektivnější koncentraci (0,25 mM CSM-539; 0,75 mM XIIIc) adherenci PAK až o 70 % v porovnání s neošetřenými buňkami. Tyto multivalentní inhibitory se proto zdají být slibnými sloučeninami pro další studie.

Výhoda syntetických multivalentních inhibitorů ve srovnání se slepičími protilátkami spočívá v jejich definované struktuře a díky tomu výrazně vyšší reprodukovatelnosti jejich

chování. Použitím těchto inhibitorů se podařilo potvrdit, že v použitém *ex vivo* modelovém systému hraje PA-III významnou roli jako adhesin PAK.

## 6 Souhrn

- Byly izolovány protilátky z vaječných žloutků slepice před a po imunizaci antigenem PA-IIL  $\Delta$ G/fuc.
- Pomocí afinitní chromatografie byly izolovány specifické protilátky proti PA-IIL.
- Metodou ELISA byla ověřena schopnost specifických slepičích protilátek rozpoznat rekombinantní PA-IIL.
- S využitím metody Western blot byl v bakteriální kultuře PAK detekován PA-IIL pomocí specifických slepičích protilátek. K expresi lektinu dochází ve stacionární fázi růstu kultury při kultivaci v PS médiu v Erlenmeyerově baňce.
- Počet subkultivací buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1 nemá vliv na jejich chování v *ex vivo* modelu adhezního testu.
- Specifické protilátky proti PA-IIL nevykázaly schopnost ovlivnit adhezi PAK k buňkám plicního epitelu.
- Multivalentní inhibitory PA-IIL na bázi fukosy mají schopnost výrazně snížit adhezi PAK na plicní epitelální buňky (až o 70 %).

# Seznam použité literatury

1. Orenstein, D. M., Spahr, J. E. & Weiner, D. J. *Cystic Fibrosis: A Guide for Patient and Family*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2012).
2. Allgood, S. J., Kozachik, S., Alexander, K. A., Thaxton, A., Vera, M. & Lechtzin, N. Descriptions of the Pain Experience in Adults and Adolescents with Cystic Fibrosis. *Pain Manag. Nurs.* **19**, 340–347 (2018).
3. Allen, J. L., Panitch, H. B. & Rubenstein, R. C. *Cystic Fibrosis*. (Taylor & Francis, 2010).
4. Balaščaková, M., Holubová, A., Skalická, V., Zemková, D., Kračmar, P., Gonsorčíkova, L., Čamajová, J., Piskáčková, T., Lebl, J., Dřevínek, P., Gregor, V., Vávrová, V., Votava, F. & Macek, M. Pilot newborn screening project for cystic fibrosis in the Czech Republic: Defining role of the delay in its symptomatic diagnosis and influence of ultrasound-based prenatal diagnosis on the incidence of the disease. *J. Cyst. Fibros.* **8**, 224–227 (2009).
5. Szymczak, A., Ksiazek, P., Mojsym-Korybska, S., Skorupa, W. & Zbikowska-Machul, A. Developing a diagnostic test to identify the selected mutation within the CFTR gene that determines the onset of cystic fibrosis. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* **31**, 200–203 (2018).
6. Patrick, A. E., Karamyshev, A. L., Millen, L. & Thomas, P. J. Alteration of CFTR transmembrane span integration by disease-causing mutations. *Mol. Biol. Cell* **22**, 4461–4471 (2011).
7. Farinha, C. M. *CFTR and Cystic Fibrosis: From Structure to Function*. (Springer International Publishing, 2018).
8. Sheppard, D. N. & Welsh, M. J. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* **79**, S23–45 (1999).
9. Shcheynikov, N., Kim, K. H., Kim, K.-M., Dorwart, M. R., Ko, S. B. H., Goto, H., Naruse, S., Thomas, P. J. & Muallem, S. Dynamic control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl(-)/HCO<sub>3</sub>(-) selectivity by external Cl(-). *J. Biol. Chem.* **279**, 21857–21865 (2004).
10. Bush, A., Bilton, D. & Hodson, M. *Hodson and Geddes' Cystic Fibrosis*. (CRC Press, 2015).
11. Southern, K. W. ΔF508 in cystic fibrosis: willing but not able. *Arch. Dis. Child.* **76**, 278–282 (1997).
12. Linsdell, P. & Hanrahan, J. W. Adenosine Triphosphate-dependent Asymmetry of Anion Permeation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Chloride Channel. *J. Gen. Physiol.* **111**, 601–614 (1998).



13. Gao, L., Kim, K. J., Yankaskas, J. R. & Forman, H. J. Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. *Am. J. Physiol.* **277**, L113-118 (1999).
14. Stutts, M. J., Canessa, C. M., Olsen, J. C., Hamrick, M., Cohn, J. A., Rossier, B. C. & Boucher, R. C. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* **269**, 847–850 (1995).
15. Wanner, A., Salathé, M. & O’Riordan, T. G. Mucociliary clearance in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 1868–1902 (1996).
16. Matsui, H., Grubb, B. R., Tarran, R., Randell, S. H., Gatzky, J. T., Davis, C. W. & Boucher, R. C. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* **95**, 1005–1015 (1998).
17. Knowles, M. R. & Boucher, R. C. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J. Clin. Invest.* **109**, 571–577 (2002).
18. Mall, M. A. Role of cilia, mucus, and airway surface liquid in mucociliary dysfunction: lessons from mouse models. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **21**, 13–24 (2008).
19. Mall, M. A. & Elborn, J. S. *Cystic Fibrosis: ERS Monograph*. (European Respiratory Society, 2014).
20. Imundo, L., Barasch, J., Prince, A. & Al-Awqati, Q. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 3019–3023 (1995).
21. Bryan, R., Kube, D., Perez, A., Davis, P. & Prince, A. Overproduction of the CFTR R domain leads to increased levels of asialoGM1 and increased *Pseudomonas aeruginosa* binding by epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **19**, 269–277 (1998).
22. Krivan, H. C., Roberts, D. D. & Ginsburg, V. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc beta 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 6157–6161 (1988).
23. Saiman, L. & Prince, A. *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **92**, 1875–1880 (1993).
24. Adam, E. C., Mitchell, B. S., Schumacher, D. U., Grant, G. & Schumacher, U. *Pseudomonas aeruginosa* II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **155**, 2102–2104 (1997).
25. Barasch, J., Kiss, B., Prince, A., Saiman, L., Gruenert, D. & Al-Awqati, Q. Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* **352**, 70 (1991).
26. Poschet, J., Boucher, J., Tattersson, L., Skidmore, J., Van Dyke, R. & Deretic, V. Molecular basis for defective glycosylation and *Pseudomonas* pathogenesis in cystic fibrosis lung. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 13972–13977 (2001).
27. Boucher, R. C. An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. (2002).

28. Jeffries, J. L., Jia, J., Choi, W., Choe, S., Miao, J., Xu, Y., Powell, R., Lin, J., Kuang, Z., Gaskins, H. R. & Lau, G. W. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin modulates mucin glycosylation with sialyl-Lewis x to increase binding to airway epithelial cells. *Mucosal Immunol.* **9**, 1039–1050 (2016).
29. Lamblin, G., Degroote, S., Perini, J.-M., Delmotte, P., Scharfman, A., Davril, M., Lo-Guidice, J.-M., Houdret, N., Dumur, V., Klein, A. & Rousse, P. Human airway mucin glycosylation: A combinatorial of carbohydrate determinants which vary in cystic fibrosis. *Glycoconj. J.* **18**, 661–684 (2001).
30. Carnoy, C., Ramphal, R., Scharfman, A., Lo-Guidice, J.-M., Houdret, N., Klein, A., Galabert, C., Lamblin, G. & Roussel, P. Altered Carbohydrate Composition of Salivary Mucins from Patients with Cystic Fibrosis and the Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **9**, 323–334 (1993).
31. Murray, P. R., Rosenthal, K. S. & Pfaller, M. A. *Medical Microbiology*. (Elsevier Health Sciences, 2012).
32. Kayser, F. H., Bienz, K. A. & Eckert, J. *Medical Microbiology*. (Thieme, 2011).
33. Lorè, N. I., Cigana, C., De Fino, I., Riva, C., Juhas, M., Schwager, S., Eberl, L. & Bragonzi, A. Cystic fibrosis-niche adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* reduces virulence in multiple infection hosts. *PLoS One* **7**, e35648 (2012).
34. Ramos, J. L. & Filloux, A. *Pseudomonas: Volume 6: Molecular Microbiology, Infection and Biodiversity*. (Springer Netherlands, 2010).
35. Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J. & Greenberg, E. P. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407**, 762–764 (2000).
36. Parad, R. B., Gerard, C. J., Zurakowski, D., Nichols, D. P. & Pier, G. B. Pulmonary outcome in cystic fibrosis is influenced primarily by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and immune status and only modestly by genotype. *Infect. Immun.* **67**, 4744–4750 (1999).
37. Gawish, A. A., Mohammed, N. A., El-Shennawy, G. A. & Mohammed, H. A. An investigation of type 3 secretion toxins encoding-genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a University Hospital in Egypt. *J. Microbiol. Infect. Dis.* **3**, (2013).
38. San Francisco, M. & San Francisco, B. *Host-Microbe Interactions*. (Academic Press, 2016).
39. Ryan, K. J., Ray, C. G., Ahmad, N., Drew, W. L. & Plorde, J. J. *Sherris Medical Microbiology, Sixth Edition*. (McGraw Hill Professional, 2014).
40. Sharon, N. & Lis, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* **177**, 949–959 (1972).
41. Gilboa-Garber, N. in *Methods Enzymol.* **83**, 378–385 (Academic Press, 1982).

42. Wu, A. M. *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-3*. (Springer US, 2011).
43. Sudakevitz, D. & MIZRAHI, L. Regulation of lectin production in pseudomonas-aeruginosa by culture medium composition. in **15**, 97–97 (Israel journal of medical sciences 2 Etzel St, French Hill, Jerusalem 97853, Israel, 1979).
44. Winzer, K., Falconer, C., Garber, N. C., Diggle, S. P., Camara, M. & Williams, P. The Pseudomonas aeruginosa Lectins PA-IL and PA-IIL Are Controlled by Quorum Sensing and by RpoS. *J. Bacteriol.* **182**, 6401–6411 (2000).
45. Grishin, A. V., Krivozubov, M. S., Karyagina, A. S. & Gintsburg, A. L. Pseudomonas Aeruginosa Lectins As Targets for Novel Antibacterials. *Acta Naturae* **7**, 29–41 (2015).
46. Mitchell, E., Houles, C., Sudakevitz, D., Wimmerova, M., Gautier, C., Pérez, S., Wu, A. M., Gilboa-Garber, N. & Imberty, A. Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **9**, 918–921 (2002).
47. Sabin, C., Mitchell, E. P., Pokorná, M., Gautier, C., Utille, J.-P., Wimmerová, M. & Imberty, A. Binding of different monosaccharides by lectin PA-IIL from Pseudomonas aeruginosa: Thermodynamics data correlated with X-ray structures. *FEBS Lett.* **580**, 982–987 (2006).
48. Glick, J. & Garber, N. The Intracellular Localization of Pseudomonas aeruginosa Lectins. *Microbiology* **129**, 3085–3090 (1983).
49. Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. Pseudomonas aeruginosa lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* **151**, 1313–1323 (2005).
50. Vašková, L., Nosková, L., Bláhová, B., Wimmerová, M., Dřevínek, P., Kubíčková, B., Stiborová, M. & Hodek, P. Evaluation of anti-PAIIL lectin hen yolk antibody as an agent inhibiting Pseudomonas aeruginosa adherence to epithelial cells. *Monatshefte Für Chem. - Chem. Mon.* **147**, 889–896 (2016).
51. Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R. & Roitt, I. M. *Essential Immunology*. (John Wiley & Sons, 2017).
52. Murphy, K. M. *Janeway's Immunobiology*. (Taylor & Francis Group, 2011).
53. Schade, R. *Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application: IgY-Technology*. (Springer-Verlag, 2001).
54. Sun, S., Mo, W., Ji, Y. & Liu, S. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **RCM 15**, 708–712 (2001).

55. Gilgunn, S., Millán Martín, S., Wormald, M. R., Zapatero-Rodríguez, J., Conroy, P. J., O’Kennedy, R. J., Rudd, P. M. & Saldoval, R. Comprehensive N-Glycan Profiling of Avian Immunoglobulin Y. *PLoS ONE* **11**, (2016).
56. Abdou, A. M., Ahmed, M. M. E., Yamashita, Y. & Kim, M. Immunoglobulin: A Natural Way to Suppress *Helicobacter pylori* in Humans. *Health (N. Y.)* **2014**, (2014).
57. Chalghoumi, R., Beckers, Y., Portetelle, D. & Théwis, A. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* (2009).
58. Schade, R., Staak, C., Hendriksen, C., Erhard, M., Hugl, H., Koch, G., Larsson, A., Pollmann, W., Van Regenmortel, M. & Rijke, E. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. *Altern. Lab. Anim.* **24**, 925–934 (1996).
59. Schade, R., Pfister, C., Halatsch, R. & Henklein, P. Polyclonal IgY antibodies from chicken egg yolk - an alternative to the production of mammalian IgG type antibodies in rabbits. *ATLA Altern. Lab. Anim.* (1991).
60. Schade, R., Calzado, E. G., Sarmiento, R., Chacana, P. A., Porankiewicz-Asplund, J. & Terzolo, H. R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim* **33**, 129–54 (2005).
61. Nilsson, E., Larsson, A., Olesen, H. V., Wejåker, P.-E. & Kollberg, H. Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* **43**, 892–899 (2008).
62. Nilsson, E., Kollberg, H., Johannesson, M., Wejåker, P.-E., Carlander, D. & Larsson, A. More Than 10 Years’ Continuous Oral Treatment with Specific Immunoglobulin Y for the Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: A Case Report. *J. Med. Food* **10**, 375–378 (2007).
63. Wittmann, V. & Pieters, R. J. Bridging lectin binding sites by multivalent carbohydrates. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 4492–4503 (2013).
64. Dam, T. K. & Brewer, C. F. in *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* (ed. Horton, D.) **63**, 139–164 (Academic Press, 2010).
65. Utratna, M., Deegan, S. & Joshi, L. Exploitation of Glycobiology in Anti-Adhesion Approaches against Biothreat Agents. *J. Bioterrorism Biodefense* **7**, 1–9 (2016).
66. Chabre, Y. M. & Roy, R. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. (Academic Press, 2010).
67. Chabre, Y. M. & Roy, R. Recent trends in glycodendrimer syntheses and applications. *Curr. Top. Med. Chem.* **8**, 1237–1285 (2008).

68. Bernardi, A., Jiménez-Barbero, J., Casnati, A., Castro, C. D., Darbre, T., Fieschi, F., Finne, J., Funken, H., Jaeger, K.-E., Lahmann, M., K. Lindhorst, T., Marradi, M., Messner, P., Molinaro, A., V. Murphy, P., Nativi, C., Oscarson, S., Penadés, S., Peri, F., J. Pieters, R., Renaudet, O., Reymond, J.-L., Richichi, B., Rojo, J., Sansone, F., Schäffer, C., Bruce Turnbull, W., Velasco-Torrijos, T., Vidal, S., Vincent, S., Wennekes, T., Zuilhof, H. & Imberty, A. Multivalent glycoconjugates as anti-pathogenic agents. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 4709–4727 (2013).
69. Sigma-Aldrich. Cyanogen Bromide-Activated Matrices. <[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/c9142pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c9142pis.pdf)> (6. 3. 2019)
70. ATCC. CuFi-1 (ATCC® CRL4013™). <<https://www.atcc.org/~ps/CRL-4013.ashx>> (29. 3. 2019)
71. ATCC. NuLil (ATCC® CRL4011™). <<https://www.atcc.org/~ps/CRL-4011.ashx>> (29. 3. 2019)
72. Chi, E., Mehl, T., Nunn, D. & Lory, S. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells. *Infect. Immun.* **59**, 822–828 (1991).
73. Sigma-Aldrich. PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labeling. <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/mini26bul.pdf>> (29. 3. 2019)
74. Sigma-Aldrich. PKH67 Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labeling. <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/pkh67glbul.pdf>> (29. 3. 2019)
75. Nosková, L. *Studium adheze Pseudomonas aeruginosa na buňky plicního epitelu, Diplomová práce.* (PřF UK, 2013).
76. Vašková, L. *Studium vlivu IgY na interakce bakterií a plicních buněk v podmínkách ex vivo, Diplomová práce.* (PřF UK, 2016).
77. Thermo Fisher Scientific. Pierce® Microplate BCA Protein Assay Kit –Reducing Agent Compatible. <[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011614\\_Pierce\\_MicroplateBCAProteinAssay\\_ReducAgntComp\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011614_Pierce_MicroplateBCAProteinAssay_ReducAgntComp_UG.pdf)> (20. 4. 2019)
78. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
79. A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection. <[http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6040.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf)> (6. 3. 2019)
80. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4354 (1979).

81. Kollberg, H. Avian Antibodies (IgY) to Fight Antibiotic Resistance. *Clin. Microbiol. Open Access* **4**, 1–5 (2015).
82. ATCC. Passage Number effects in cell lines.  
<<https://www.atcc.org/~media/pdfs/technical%20bulletins/tb07.ashx>> (20. 4. 2019)
83. Vašková, M. *Protilátky proti lektinu PA-IIL jako prostředek prevence bakteriálních infekcí u pacientů s cystickou fibrosou, Diplomová práce.* (PřF UK, 2017).
84. Boukerb, A. M., Rousset, A., Galanos, N., Méar, J.-B., Thépaut, M., Grandjean, T., Gillon, E., Cecioni, S., Abderrahmen, C., Faure, K., Redelberger, D., Kipnis, E., Dessein, R., Havet, S., Darblade, B., Matthews, S. E., de Bentzmann, S., Guéry, B., Cournoyer, B., Imbert, A. & Vidal, S. Antiadhesive properties of glycoclusters against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J. Med. Chem.* **57**, 10275–10289 (2014).
85. Kašáková, M., Malinová, L., Klejch, T., Hlaváčková, M., Dvořáková, H., Fujdiarová, E., Rottnerová, Z., Mařátková, O., Lhoták, P., Wimmerová, M. & Moravcová, J. Selectivity of original C-hexopyranosyl calix[4]arene conjugates towards lectins of different origin. *Carbohydr. Res.* **469**, 60–72 (2018).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

<b>Jméno a příjmení Adresa</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum vypůjčení</b>	<b>Poznámka</b>